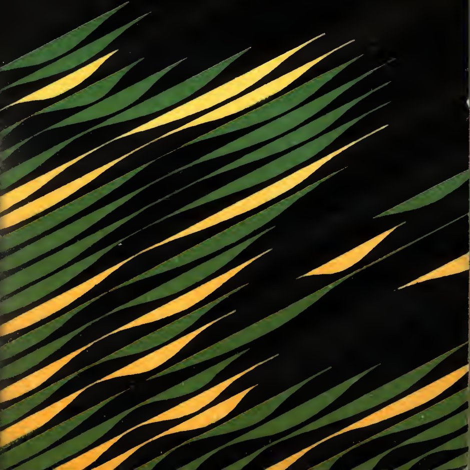
Биологическая активность эфирных масел



В. В. НИКОЛАЕВСКИЙ
А. Е. ЕРЕМЕНКО
И. К. ИВАНОВ

Биологическая активность эфирных масел



МОСКВА
МЕДИЦИНА
1987

УДК 615.322:581.135.51].015.4

НИКОЛАЕВСКИЙ В. В., ЕРЕМЕНКО А. Е., ИВАНОВ И. К. Биологическая активность эфирных масел.— М.: Медицина, 1987.— 144 с., ил.

Авторы книги — сотрудники Ялтинского НИИ физических методов лечения и медицинской климатологии им. И. М. Сеченова. В. В. НИКОЛАЕВСКИЙ — д-р мед. наук, А. Е. ЕРЕМЕНКО и И. К. ИВАНОВ — канд. мед. наук.

В монографии обобщены данные литературы и результаты собственных экспериментальных исследований эфирных масел — основного субстрата фитонцидов эфиромасличных растений. Биологическую активность эфирных масел исследовали на субклеточном, органном и организменном уровнях для получения экспериментальных данных о возможности разработки на их основе новых лечебных и профилактических средств. Большое внимание уделено иммуномодулирующей активности эфирных масел, их способности оказывать гипосенсибилизирующее и противовоспалительное действие. Представлены данные о распределении эфирных масел в организме при различных путях введения.

Табл. 10, рис. 5, список литературы 145 назв.

Для фармакологов, иммунологов.

Рецензент: **С. Я. Соколов** — д-р мед. наук, зав. лабораторией фармакологии ВИЛР.

Монография

Владислав Владимирович Николаевский,
Александр Евгеньевич Еременко,
Игорь Константинович Иванов

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Зав. редакцией **Ю. М. Махотин**. Научный редактор **Е. А. Гоголина**. Художественный редактор **С. М. Лымина**. Художник **А. Е. Григорьев**. Технический редактор **Н. В. Сорокина**. Корректор **Л. А. Кокарева**

ИБ № 4203

Сдано в набор 13.01.87. Подписано к печати 15.05.87. Т-03767. Формат бумаги 84×108 1/32. Бумага тип. № 2. Гарнитура лит. Печать высокая. Усл. печ. л. 7,56. Усл. кр.-отт. 7,86. Уч.-изд. л. 9,02. Тираж 4700 экз. Заказ № 1632. Цена 1 р. 10 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Медицина». 101000, Москва, Петроверигский пер., 6/8.

Областная ордена «Знак Почета» типография им. Смирнова Смоленского облуправления издательств, полиграфии и книжной торговли, 214000, г. Смоленск, проспект им. Ю. Гагарина, 2.

Н $\frac{4108000000-293}{039(01)-87}$ 38—87

ПРЕДИСЛОВИЕ

Проблема эфирных масел в последние 20—25 лет стала достаточно актуальной. Ей посвящаются регулярные международные конгрессы, всесоюзные конференции и совещания, она интересует специалистов самого различного профиля. Фитонциды привлекают особое внимание биологов, микробиологов, иммунологов, гигиенистов, пульмонологов и других специалистов. Достижения в области изучения фитонцидов нашли отражение в ряде монографий [Токин Б. П., 1980; Гродзинский А. М., 1983; Корсуп В. Ф., 1983; Мамчур Ф. Г., 1983; Сарнецкий Г. А., 1983; Айзенман Б. Е. и др., 1984; Данилевский Н. Ф. и др., 1984; Иванченко В. А., 1984; Танасиенко Ф. С., 1985]. К сожалению, в указанных работах не нашли достаточного освещения вопросы биологической активности эфирных масел. В предлагаемой читателю монографии изложены результаты исследований биологических свойств эфирных масел, проводившихся в течение ряда лет в Ялтинском НИИ физических методов лечения и медицинской климатологии им. И. М. Сеченова.

Проблема эфирных масел далеко не исчерпывается и не ограничивается возможностью расширения за их счет круга антибактериальных препаратов. Эфирные масла — это прежде всего естественный концентрат фитонцидов эфиромасличных растений, в жидком виде содержащий значительную часть летучих фракций. В силу этого, применяя эфирные масла, можно решать или облегчать решения многих проблем, относящихся непосредственно к фитонцидам (например, эффективность преимущественно свежеприготовленных препаратов фитонцидов, значительная вариабельность состава, трудности дозирования и др.). Можно ориентировочно наметить ряд областей, в которых применение фитонцидов (в виде эфирных масел) представляется чрезвычайно эффективным. Прежде всего это оптимизация состава воздуха закрытых помещений в ме-

стах массового скопления или длительного пребывания людей. Воздух в таких помещениях по составу значительно отличается от нормальной атмосферы даже в случае поддержания основных физико-химических характеристик: газового состава, температуры и влажности (за счет кондиционеров и увлажнителей). Основным отрицательным свойством является резко сниженная биологическая активность воздуха закрытых помещений.

Развитие живых организмов в естественной атмосфере на протяжении всей эволюции, тесный контакт в течение многих тысячелетий привели к формированию определенной зависимости живых систем (и организма человека) от летучих биологически активных веществ растительного происхождения. В пользу этого свидетельствует целый ряд фактов, в частности, значительное сходство химической структуры некоторых компонентов фитонцидов (и эфирных масел) и некоторых важных регуляторных факторов организма, например, предшественников стероидных гормонов, простагландинов и др.

Летучие фитонциды являются одними из регуляторов физико-химических свойств воздушной среды. Так, они повышают радиоактивный фон, что сопровождается возрастанием концентрации легких отрицательных ионов, благоприятно действующих на человека, и снижением количества тяжелых ионов. Фитонциды выполняют функцию по «обеспечению» атмосферного воздуха биологически активным кислородом. А это важно, поскольку человек может испытывать кислородное голодание даже при нормальном его содержании в воздухе, если кислород слабо ионизирован. Под влиянием фитонцидов повышается бактерицидность воздуха, они способствуют оседанию пылевых частиц, уменьшают электрический показатель загрязненности воздуха и др. Кроме того, эти вещества обусловливают неповторимый аромат и свежесть воздуха, что положительно влияет на эмоциональное состояние человека. И, наконец, летучие фитонциды являются поставщиками необходимых для человека веществ: витаминоподобных, гормоноподобных, а также компонентов, идущих на построение биологических комплексов.

Таким образом, летучие фитонциды являются одними из природных факторов, обусловливающих целебные свойства воздуха, его благоприятное воздействие на здоровье и самочувствие человека. Вот почему с проблемой фитонцидов в первую очередь тесно связаны широкие перспективы их использования в санаторно-курортной практике. Так,

при научном обосновании районирования санаторио-курортных учреждений необходимо учитывать влияние летучих фитонцидов зеленых насаждений на отдыхающих и больных.

В интересах более эффективного оздоровления атмосферного воздуха за счет летучих фитонцидов возникает необходимость в расширении исследований по подбору оптимальных композиций деревьев, кустариков, цветов — источников летучих фитонцидов — с учетом профиля санатория.

В ряде работ показано, что содержание в воздухе фитонцидов является ценным дополнительиым фактором климатотерапии.

Еще не нашли широкого использования в курортной практике фитонциды в виде ароматизированных ванн и напитков, а также применения лечебиых массажей, растирок и физиотерапевтических процедур с использованием эфирных масел, обтирания тела ароматизированной водой и др. И это понятно. Научных разработок в этом плаие почти нет.

Фитонцидам свойствеи выраженный лечебный эффект при некоторых заболеваниях легких, сердца, нервной системы и др. Поэтому при их дефиците в воздухе (например, в зимнее время или в условиях Крайнего Севера) возникает необходимость в проведении курса ароматотерапии, при которой больной дополнительно получает порции фитонцидов, необходимые ему для нормализации функции различных систем организма. Фитонциды обладают, по-видимому, выраженными профилактическими свойствами, что проявляется в определенной зависимости между концентрацией ароматических веществ в атмосфериом воздухе и уровнем заболеваемости. В связи с этим разработка оптимальных способов коррекции с помощью фитонцидов состава воздуха в местах общественного пользования и других закрытых помещениях с массовым скоплением или с длительным пребыванием людей, повышение биологической активности этого воздуха, возможно, явятся одним из путей массовой профилактики заболеваемости, особенно в зимнее время и в севериых районах.

Коррекция состава воздуха помещений с помощью эфирных масел проводится и с другой целью — для повышеиия работоспособности, регулирования самочувствия и эмоционального состояния человека, выявления скрытых резервов оргаиизма.

Таким образом, фитоициды представляют большой ин-

терес для медицинской наукн. В этом направлении уже проводнтся определенная нсследовательская работа. Однако нспользованне эфнрных масел прн разработке конкретных способов такого применення должно предваряться подробными исследованиямн нх бнологнческого действия на различных уровнях органнзацнн жнвых органнзмов, выбором наиболее актнвных н безвредных образцов и др. Именно такого рода данные и приведены в книге.

Другая возможная область применения эфирных масел базнруется на том, что результаты проведенного намн исследования эфнрных масел позволяют разработать на их основе новые нммуномодулнрующие препараты.

Кроме того, эфирные масла обладают высокой антноксплнтельной актнвностью, не уступающей таковой у нанболее актнвных антноксндантов. Представляется оправданным предположение о возможности разработки на основе эфнрных масел препаратов, обладающих антиокнслнтельной актнвиостью, разнообразных консервантов для пищевой промышленности.

Можно отметнть по крайней мере еще две областн возможного прнменення эфнрных масел. Получены данные, позволяющне предположнть возможность разработки на основе нзученных нами эфирных масел препаратов нли средств адаптогенного действия на человека. Эфнрные масла могут быть применены в ветерннарнн в качестве лечебных препаратов, средств анаболнческого действия, средств оптнмнзации воздуха помещеннй для животных, а также дезннфицирующих средств, не обладающих вредным действием на органнзм. Безусловно, это ие исчерпывает всех возможных путей применення эфнриых масел.

Часть I

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В ОПЫТАХ IN VITRO

Глава 1

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Бактерицидное действие на условно-патогенные микроорганизмы

Широкое использование антибиотиков и сульфаниламидных препаратов привело к значительному повышению эффективности лечения инфекционных заболеваний. Однако с течением времени выявились и негативные последствия антибиотикотерапии. Установлено, что антибиотики способствуют селекции резистентных штаммов микроорганизмов, трансформируют их в L-формы, вызывают мутационные изменения генетических структур бактерий и др. [Кудлай Д. Г. и др., 1972; Тимаков В. Д. и др., 1973; Спиранская О. Н., 1976]. Клиницисты отметили, что антибиотики обусловливают возникновение аллергии, снижение иммунитета, повышение кандидозных поражений органов и систем [Кашкин П. Н. и др., 1970; Александер Дж. и др., 1974]. В этой связи поиск новых видов антибактериальных препаратов является важной и актуальной проблемой медицины.

Одним из перспективных средств для решения проблемы могут быть биологически активные вещества (БАВ) растительного происхождения, в частности эфирные масла. Изучению бактерицидных и бактериостатических свойств эфирных масел посвящена обширная литература. Исследования проводились в Болгарии, Венгрии, Чехословакии, США, Англии, Австралии, Бразилии, Мексике, Канаде, Индии, Японии, Китае, на Филиппинах и других странах мира [Бондаренко А. С., 1981; Смирнов В. В. и др., 1985]. Активно изучались масла растений Азербайджана, Дагестана, Прикарпатья, дикорастущих эфироносов Крыма и многих других представителей флоры нашей страны [Алиев Р. Н. и др., 1971; Дзюбак С. Г. и др., 1972; Богуцкий Б. В. и др., 1978, 1980, 1981; Бондаренко А. С. и др., 1985; Иванов И. К., 1982, 1985].

В экспериментах установлено, что большинство эфирных масел обладает противомикробным действием. Напри-

мер, такое действие проявляют фитонциды настурции, петунии, котовника, лаванды [Приходько В. А. и др., 1975; Щербановский Л. Р., 1975; Капелев О. И., 1985]. Выявлена противомикробная активность эфирных масел чабреца, базилика, эфиромасличной розы, чабера колосоносного, бедренца ароматного, зизифоры, иссопа, лесной мяты, тысячелистника хрящеватого, можжевельника казацкого и др. [Нешта М. Д. и др., 1973; Рахимова И. В. и др., 1974; Юрчак Л. Д. и др., 1985, и др.]. Показано, что наибольшей бактерицидной активностью обладают эфирные масла из растений семейства губоцветных [Тютюник В. И. и др., 1977]. В большинстве случаев эти вещества проявляют широкое противомикробное действие [Щербановский Л. Р. и др., 1975; Евсеенко О. В. и др., 1985, и др.]. Они активно подавляют рост гемолитических стафилококков, стрептококков, представителей тифо-дизентерийной группы микроорганизмов [Рамазанова Н. Х., 1980; Жунгиетч И. И., 1985; Капелев О. И. и др., 1985, и др.]. Отмечено, что на кокковидные микроорганизмы эфирные масла влияют активнее, чем на палочковидные бактерии. Наибольшей резистентностью к БАВ растительного происхождения обладают вульгарный протей, синегнойная палочка, клебсиеллы [Тютюник В. И. и др., 1977; Акимов Ю. А. и др., 1985].

Изучение фунгицидного действия эфирных масел показало, что масла эффективно ингибируют рост грибов [Ибрагимов Г. Г. и др., 1983; Давидюк Л. П. и др., 1985; Преображенская Н. Е. и др., 1985, и др.]. Эксперименты проводились с разнообразными видами патогенных и непатогенных штаммов. Установлено, что патогенные грибы проявляют более выраженную чувствительность к маслам, чем непатогенные культуры [Зелепуха С. И., 1975].

Эфирные масла сильнее действовали на грибы, чем на кокковидные и тем более палочковидные формы микроорганизмов [Андропова Н. Н., 1985]. Например, Л. Р. Щербановский и соавт. (1975) обнаружили, что для подавления роста дрожжеподобных грибов рода Candida эфирным маслом укропа фунгицидная доза этого масла должна быть в 2 раза меньше дозы, ингибирующей жизнедеятельность молочно-кислых бактерий. По мнению Г. И. Нилова и соавт. (1967) и других авторов, эфирные масла являются перспективными веществами для создания антифунгицидных препаратов. Это подтверждено и Ф. Ф. Протопоповым (1967), который наблюдал высокую эффективность мятного и тминного масел при лечении дрожжевых эрозий рук и руброфитии ногтей.

Однако наряду с достигнутыми успехами в изучении БАВ растительного происхождения многие вопросы остаются нерешенными. Отмечаются и некоторые методические недостатки проведенных экспериментов. А. С. Бондаренко (1981) указывает, что исследования БАВ в различных научных учреждениях ведутся нестандартными методами, вследствие чего учет результатов и полученные данные неидентичны. Неодинаковы и способы приготовления БАВ. В итоге все это затрудняет анализ материалов, полученных разными авторами. Учитывая это, мы изучили антимикробную активность 46 эфирных масел, их фракций, компонентов и отходов вторичного сырья при производстве эфирных масел, используя стандартный метод серийных разведений. В основном исследовали масла промышленного производства, полученные способом перегонки надземной части растений с водяным паром. Эти вещества представляли из себя сложные многокомпонентные химические соединения и выпускались для употребления в парфюмерно-косметической, пищевой, химической промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Исследования антимикробной активности эфирных масел проводили методом серийных разведений 1% спиртового раствора масел в мясопептонном бульоне (МПБ). Посевная доза бактерий равнялась 1000 микробных клеток на 1 мл питательной среды. Посевы инкубировали в течение 24 ч при 37 °С, затем их высевали на мясопептонный агар (МПА). Параллельно ставили все необходимые контроли (МПБ без добавок масел, контроли со спиртом и др.). Результаты оценивали по интенсивности роста бактерий на МПА. Активными считали БАВ с бактерицидной концентрацией не более 400 мкг/мл.

В работе использовали 12 тест-культур: Staphylococcus aureus 209, Streptococcus pyogenes, Neisseria catarralis, Esherichia coli O-111, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Bordetella Bronchiseptica, Alcaligenes faecalis, Citrobacter OG, Enterobacter cloacea, Serratia marcescens.

Оказалось, что из всех изученных нами эфирных масел наибольшей антимикробной активностью обладало эфирное масло монарды (табл. 1). Наиболее выраженный бактерицидный эффект масла монарды наблюдался при его действии на Str. pyogenes и Neisseria catarralis (бактерицидная доза 125 мкг/мл). Достаточно активно оно действовало на Alc. faecalis и St. aureus 209 (бактерицидная доза составила соответственно 200 и 250 мкг/мл). Другие виды микроорганизмов погибали при концентрации масла монарды, равной 400 мкг/мл. Это масло оказалось малоактивным в отношении Ps. aeruginosa, Citrobacter OA, Serratia marcensens. Масла базилика, лофанта и фенхеля были эффективны в отношении 4 видов микроорганизмов.

Таблица 1. Антимикробная активность (мкг/мл) эфирных масел, их фракций, компонентов и отходов вторичного сырья при производстве эфирных масел

Растения	Вид микроорганизмов											
	Staphylococcus aureus 209	Streptococcus pyogenes	Neisseria catarralis	Escherichia coli 0-111	Proteus vulgaris	Klebsiella pneumoniae	Pseudomonas aeroginosa	Bordetella bronchoseptica	Aecacaligenes faecalis	Citrobacter OA	Enterobacter cloacae	Serratia marcescens
Monarda Fistulosa L. (монарда дудчатая)	250	125	125	400	400	400	>400**	400	200	>400	400	>400
Ocimum gratissimum L. (базилик эвгенольный)	200	125	>400	>400	>400	400	>400	400	>400	>400	>400	>400
Lophantus L. (лофант)	>400	250	250	>400	400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400
Foemiculum vulgare Miller (фенхель обыкновенный)	200	>400	250	>400	>400	>400	>400	400	400	>400	>400	400
Nepeta catoria L. (котовник лимонный)	400	250	**	>400	>400	>400	>400	400	400	>400	>400	>400
Pelargonium roseum L. (герань розовая)	>400	125	125	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Salvia officinalis L. (шалфей лекарственный)	>400	>400	—	>400	>400	>400	>400	400	>400	400	—	>400
Artemisia pontica L. (полынь крымская)	>400	—	250	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Coriandrum sativum L. (кориандр посевной)	>400	400	250	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Anethum graveolus L. (укроп пахучий)	>400	>400	250	—	>400	>400	>400	>400	>400	>400	—	>400

Mentha piperita L. (мята перечная)	>400	250	>400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Petroselinum sativum L. (петрушка посевная)	>400	400	>400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400	400
Zaseritium hispidum L. (гладыш щетинисто-волокнистый)	>400	—	400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Carum Ajowan L. (ажгон душистый)	>400	250	>400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Pogostamon patchouli (пачули)	200	—	—	>400	—	—	>400	—	—	—	—	—
Satureja montana (чабер горный)	250	—	—	>400	—	—	>400	—	—	—	—	—
Acorus calamus L. (аир болотный)	400	—	—	>400	—	—	>400	—	—	—	—	—
Mentha piperita L. (мята сырец)	400	—	—	>400	—	—	>400	—	—	—	—	—
Cistus ladaniferus (ладанник экстракт)	400	—	—	>400	—	—	>400	—	—	—	—	—
Elsholtcia stauntonii (эльшольция Стаунтона)	400	—	—	>400	—	—	>400	—	—	—	—	—
Laurus nobilis L. (вторичное масло лавра благородного)	400	—	—	400	—	—	>400	—	—	—	—	—
Фенольная фракция эфирного масла монарды дудчатой	125	—	—	250	250	250	>400	125	125	250	250	250
Тимол	250	—	—	400	400	400	>400	>400	400	>400	400	400

Примечание. Перечень названий растений, из которых получены эфирные масла, приведен в соответствии с их бактерицидной активностью.

* >400 — действие эфирных масел на микроорганизмы малоэффективное.
** Исследование не проводилось.

Бактерицидная доза масел этих растений варьировала в пределах 125—400 мкг/мл. Эфирные масла непеты, герани и шалфея действовали бактерицидно на 2—3 вида микроорганизмов, а аира, полыни, пачули, кориандра, укропа, мяты, мяты-сырца, петрушки, гладыша, ажгона, чабера, ладанника — только на один вид бактерий. Остальные масла оказались малоактивными.

Наибольшим противомикробным действием обладали фенольная фракция эфирного масла монарды (из 10 видов микроорганизмов 9 культур гибло при концентрации 125—250 мкг/мл) и тимол, основной компонент этого масла (из 10 видов бактерий 7 культур погибло при дозе 200—400 мкг/мл). Другие изученные фракции и компоненты эфирных масел были малоактивными (бактерицидная доза более 400 мкг/мл). Бактерицидное действие вторичного сырья (кубовый остаток фракционирования эфирных масел лавра и ладанника), полученного при производстве эфирных масел, оказалось невысоким. Так, противомикробное действие на St. aureus 209 оказывал только кубовый остаток масла лавра.

Эфирные масла были более активны в отношении кокковидных микробов, чем палочковидных. Так, рост St. aureus 209 подавляли 15 видов масел и их фракций, а Str. pyogenes и Neisseria catarralis — 8 видов масел. Бактерицидная доза эфирных масел для кокковидных микроорганизмов в 2/3 случаев колебалась в пределах 125 250 мкг/мл. Обратная картина наблюдалась при действии изученных веществ на палочковидные микроорганизмы: 6 видов масел эффективно действовали только на Bordetella bronchiseptica. Рост остальных палочковидных бактерий подавляли 1—5 видов масел. Ps. aeruginosa оказался совершенно нечувствительным к действию исследованных веществ.

Бактерицидная доза масел для палочковидных форм бактерий также оказалась выше, чем для кокковидных микроорганизмов. Высокоэффективной в отношении палочковидных форм бактерий была только фенольная фракция эфирного масла монарды (бактерицидная доза 125—250 мкг/мл). Эфирное масло монарды и его основной компонент тимол действовали на Alc. faecalis в концентрации 200 мкг/мл. В остальных случаях ингибирующая концентрация эфирных масел, их компонентов и фракций составляла 400 мкг/мл и более.

Таким образом, из всех изученных эфирных масел наиболее выраженное бактерицидное действие проявляли мас-

ла монарды дудчатой, базилика эвгенольного, лофанта, фенхеля обыкновенного. Эти вещества, обладая достаточно высокой противомикробной активностью, могут быть перспективными для создания бактерицидных препаратов. На кокковидные формы микроорганизмов эфирные масла действовали более эффективно и в меньших концентрациях, чем на палочковидные бактерии. Очевидно, масла целесообразнее использовать в тех случаях, когда этиологическим фактором заболевания являются кокковидные микробы.

Исследования фунгицидной активности эфирных масел показали, что масла котовника и монарды губительно действовали на Candida albicans в дозе 100 мкг/мл. Фунгицидная концентрация масла фенхеля равнялась 200 мкг/мл, а петрушки и тмина — 250 мкг/мл. Масла гладыша, лаванды, лофанта, шалфея, мяты-ректификата, мяты-сырца, непеты и вторичное масло лавра действовали на грибы в дозе 400 мкг/мл. Кубовый остаток фракционирования лаврового масла и обогащенная цинеолом фракция вторичного масла лавра ингибировали рост грибов в такой же концентрации. Остальные исследованные масла проявляли слабовыраженное фунгицидное действие.

Итак, эфирные масла котовника, монарды, фенхеля, петрушки и тмина обладают достаточно хорошим противокандидозным эффектом. Это свойство выгодно отличает их от антибиотиков, которые при длительном применении способствуют развитию грибковых поражений. По-видимому, при широком использовании эфирных масел в клинической практике они найдут повсеместное применение не только при лечении заболеваний, обусловленных условно-патогенной микрофлорой, но и при терапии кандидозов.

Действие на микоплазмы и L-формы бактерий

В последние годы большое внимание уделяется совершенствованию ранней диагностики, профилактике и лечению заболеваний, вызванных микоплазмами и L-формами бактерий. Актуальность проблемы обусловлена значительным распространением этих инфекций среди населения и высокой устойчивостью их ко многим антибактериальным препаратам [Тимаков В. Д., Каган Г. Я., 1973; Tulli J. G. et al., 1979]. Ярко выраженная резистентность микоплазм и L-форм бактерий к пенициллину и полимиксину В объясняется отсутствием у этих микроорганизмов ригидной клеточной стенки, на которую действуют антибиотики, напри-

мер, пенициллинового ряда [Прозоровский С. В. и др., 1978].

B. P. Marmion и G. M. Goodburn (1961) показали, что наиболее эффективно жизнеспособность микоплазм снижают органические соли золота и производные тетрациклина. Однако употребление препаратов из органических солей золота нередко сопровождается серьезными осложнениями [Mufson M. A. et al., 1968]. Антибиотикотерапия, способствуя выздоровлению организма и исчезновению клинических симптомов болезни, не оказывает решающего влияния на способность к носительству и распространению анализируемого инфекционного агента. По данным J. T. Grayston и соавт. (1967), выделяемость Mycoplasma pneumoniae в период заболевания и реконвалесценции в группах больных, лечившихся тетрациклином, эритромицином или не принимавших антибиотиков, была практически одинаковой. Кроме того, многие антибиотики, например эритромицин, высокоактивные в опытах in vitro, не проявляют такого эффекта in vivo [Slotcin N. L. et al., 1967]. D. M. Jones и соавт. (1973), M. Y. Kubota (1974) выявили способность Mycoplasma pneumoniae формировать устойчивость к антибактериальным препаратам (окситетрациклину, стрептомицину, эритромицину). И, наконец, антибиотикам, используемым при лечении микоплазменной и L-форменной инфекции, присущи все недостатки, характерные для антибиотикотерапии вообще.

Таким образом, изыскание и разработка новых высокоэффективных средств и способов борьбы с указанными инфекциями представляются важными и актуальными направлениями научной и практической медицины.

Мы исследовали чувствительность Mycoplasma pneumoniae FH и L-форм бактерий к эфирным маслам и их фракциям.

Действие эфирных масел на микоплазмы и L-формы бактерий определяли методом серийных разведений спиртовых растворов масел в полужидкой питательной среде, содержащей триптический перевар мышцы сердца, быка, пептон, автолизат печени, лошадиную сыворотку, набор солей, глюкозу, пенициллин и др. В связи с тем что в состав питательной среды для микоплазм и L-форм бактерий входила лошадиная сыворотка, мы не проводили контрольных опытов с повышенной белковой нагрузкой. Тест-культурами служили штаммы Mycoplasma pneumoniae FH и L-форма стрептококка 406, любезно предоставленные лабораторией латентной инфекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (Москва). Для определения посевной дозы микоплазм и L-форм бактерий проведено титрование тест-культур. Было установлено, что наиболее оптимальной посевной дозой для этих микроорганизмов является доза, равная 10^{-2} КОЕ/мл.

Для определения чувствительности микоплазмы и L-формы стрептококка 406 к эфирным маслам делали разведения навесок масел от 400 мкг/мл и выше (200, 100 и 40 мкг/мл и т. д.). Тест-культуру засевали в объеме 0,1 мл в каждую пробирку. Контролями служили посевы на питательные среды без эфирных масел. Кроме того, лошадиную сыворотку, питательную среду и посевной материал для контроля засевали на МПБ с последующим пересевом на твердые питательные среды. Эти манипуляции проводили с целью определения чистоты посева и контроля возможной реверсии L-формы стрептококка в исходный вид. Одновременно ставили контроли среды без добавок масел, контроли со спиртом и т. д. Опытные и контрольные пробы инкубировали в течение 5 дней при 37 °С.

Результаты учитывали визуально по росту шарообразных колоний исследуемых микроорганизмов в полужидкой питательной среде. Итоговые результаты оценивали по наличию или отсутствию роста микробов при пересеве их из питательных сред с добавками эфирных масел на среды, не содержащие эфирных масел. В эксперименте учитывали только бактерицидные концентрации исследуемых веществ.

Всего были изучены 21 эфирное масло и 4 фракции эфирных масел (азулен, линалилацетат, эвгенол и тимол).

Оказалось, что эфирные масла монарды и базилика проявляли в отношении микоплазмы пневмонии FH и L-формы стрептококка 406 наиболее высокую активность. Бактерицидная доза не превышала 100 мкг/мг. Эфирные масла ажгона, эвкалипта и основная фракция масла монарды тимол ингибировали рост тест-культур в концентрации 200—250 мкг/мл, а масла герани, укропа, гладыша, лаванды, шалфея, непеты, розы, лавра и розмарина — в дозе 400 мкг/мл. Остальные эфирные масла и их фракции (сосны, фенхеля, эльшольции, кориандра, лофанта, полыни, мяты, бархатца, линалилацетата и эвгенола) были малоэффективными.

По данным литературы, противомикоплазменная активность окситетрациклина, часто применяемого при лечении микоплазмозов легких, колеблется в пределах 100—300 мкг/мл, т. е. практически равнялась бактерицидной дозе эфирных масел монарды, базилика, ажгона и эвкалипта [Кирпич В. В. и др., 1976]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что эфирные масла монарды, базилика, ажгона и эвкалипта обладают высокоэффективным бактерицидным действием и по этому показателю не уступают известному противомикоплазменному антибиотику окситетрациклину.

Выявленная активность эфирных масел в отношении микоплазм и L-форм бактерий существенно расширяет противомикробный спектр действия этих масел и может быть использована в практическом здравоохранении не

только для подавления условно-патогенной микрофлоры человека, но и как средство борьбы с микоплазменной и L-форменной инфекцией.

Бактерицидное действие эфирных масел, полученных из различных клонов монарды

В настоящее время в СССР и за рубежом проводятся широкие исследования по выведению новых высокопродуктивных сортов эфиромасличных растений. Вместе с тем отмечено, что селекция эфиромасличных культур для медицинских целей ведется еще не достаточно активно.

Учитывая это, мы провели совместно с Симферопольским институтом эфиромасличных культур научно-исследовательскую работу по селекции монарды дудчатой семейства Labiatae (губоцветных). Задача этих исследований состояла в выведении нового сорта монарды с высокой противомикробной активностью. Монарда — это многолетняя культура родом из Северной Америки, представленная 16 видами [Мартынов А. М. и др., 1975]. В СССР монарда культивируется в Крыму, на Кавказе и некоторых других районах страны [Капелев И. Г., 1976; Крушенко Е. Г. и др., 1980]. По данным хроматографических исследований, масло монарды содержит до 27 компонентов [Scorn R. W., 1967]. Однако основными фракциями его являются тимол и карвакрол. В зависимости от места произрастания, вида и клонов монарда значительно отличается по химическому составу масла. Например, эфирные масла Monarda media содержат 18,5% тимола и 39,1% карвакрола, Monarda fistulosa vasmentifolia — соответственно 50,3 и 2,4%. У Monarda punktata vascoreji выделено 92,1% тимола. Карвакрол в масле этого растения полностью отсутствует. У Monarda lindhei mery наоборот, тимол не обнаружен, а фенолы представлены исключительно карвакролом [Scora R. W., 1967]. А. М. Мартынов и соавт. (1974) показали, что наиболее популярные виды монарды, произрастающие у нас в стране, содержат 27,9—65,8% тимола и 11,2—52,4% карвакрола.

По мнению многих исследователей, бактерицидный эффект масел монарды во многом зависит от концентрации в них фенолов [Виноградова И. В., 1932]. Однако убедительных данных литературы о тесной связи между этим показателем и бактерицидной активностью масла мы не обнаружили. Поэтому исследование противомикробных свойств селективных клонов монарды проводили параллельно с анализом количества в них фенолов.

В результате многолетией работы был отобран 31 клои Monarda fistulosa L., эфирные масла которых в предварительных экспериментах проявляли иаибольшую активность в отиошеиии пиогенного стафилококка. У этнх масел методом серийных разведеиий исследовали бактерицидиые свойства, а с помощью газожидкостиой хроматографии (ГЖХ) определяли количество феиолов. В качестве тест-культур использовали St. aureus 209, Esherichia coli O-111, Proteus vulgaris, Ps. aeroginosa.

Оказалось, что наибольшим бактерицидным эффектом обладали масла, выделенные из клонов № 15 и 59. Эти масла угнетали рост изученных микроорганизмов в дозе 250 мкг/мл. Эфирные масла из клонов № 6, 7, 8, 12, 23, 34, 47, 55, 61, 95, 97 и 16057-1ап бактерицидно действовали в концентрации 125—250 мкг/мл только на одну культуру микроорганизмов. Остальные масла оказались малоактивными.

Наиболее эффективно масла действовали на St. aureus 209. Его рост ингибировали в дозе 125—250 мкг/мл 48,38±8,97% масел. На E. coli O-111 и Proteus mirabilis бактерицидно действовали в концентрации 250—400 мкг/мл только 9,68±5,31% масел. Ps. aeruginosa была устойчивой ко всем исследованным маслам в дозе 400 мкг/мл.

При сравнении бактерицидных свойств исследованных масел с их химическим составом было выявлено, что в наиболее активном масле, полученном из клона № 59, преобладали фенольные соединения (сумма тимола и карвакрола достигала 64,69%). По-видимому, наличие в эфирном масле этих веществ во многом обусловливает его бактерицидный эффект. Вместе с тем масла, полученные из клонов № 8, 12, 23 и 80, имеют практически такое же количественное соотношение фенольных фракций, как и клоны № 15 и 59. У клона № 55 сумма тимола и карвакрола достигала 81,65%. Однако все эти образцы эфирных масел обладали менее выраженной противомикробной активностью, чем вещества, полученные из клонов № 15 и 69. Аналогичная картина наблюдалась и в отношении многих других образцов. Очевидно бактерицидная активность эфирных масел, выделенных из селективных клонов монарды, зависит не только от суммы фенольных соединений, но и от количественного соотношения других фракций.

Таким образом, результаты работы по селекции монарды свидетельствуют о том, что наиболее перспективными клонами для разработки противомикробных препаратов являются клоны № 15 и 59. Эфирные масла, полученные из них, обладают наиболее выраженной бактерицидной активностью.

Бактерицидное действие фракций эфирного масла монарды

Противомикробную эффективность эфирных масел можно повышать не только путем селекции растений, но и в результате выделения отдельных фракций масел, обладающих бактерицидными свойствами.

Эфирное масло монарды разделяли на фенольную и нефенольную фракции методом щелочной экстракции. Фенольную — щелочная часть масла, растворяли в воде, а нефенольную после отделения промывали до нейтральной реакции и просушивали сульфатом натрия. Перед постановкой экспериментов цельное эфирное масло монарды дудчатой и выделенные из него фракции подвергали химическому анализу. Его проводили методом ГЖХ на хроматографе «Хром-1» с внутренними стандартами (введение метчиков чистых составляющих терпеноидов эфирного масла). Разделение проводили на карбоваксе (15%), нанесенном на цеолит (измельченный кирпич). Температура ввода пробы 200 °С, температура катарометра 150 °С, температура колонки 190 °С.

Мы идентифицировали в эфирном масле монарды 12 соединений (табл. 2).

Таблица 2. **Химический состав эфирного масла, полученного из монарды дудчатой**

Компоненты, %	Неразделенное масло	Нефенольная фракция	Фенольная фракция
Камфен	11,2	0,3	0,8
Пинен	0,9	1,5	—
Лимонен	0,8	4,0	—
Оцимен	1,1	9,5	—
Цинеол	7,0	19,0	—
Линалоол	0,4	4,0	0,6
Терпинеол	2,6	10,0	—
Линалилацетат	0,8	6,1	—
Неизвестный сложный эфир	7,4	38,6	—
Борнеол	0,8	3,0	—
Тимол	48,0	0	72,0
Карвакрол	19,0	0	26,6

Антимикробную активность фракций и компонентов определяли методом серийных разведений. Исследовали фенольную и нефенольную фракции масла и его компоненты: изоборнилацетат, линалилацетат, линалоол, тимол, карвакрол. Параллельно изучали антибактериальную активность чистого эфирного масла и искусственно приго-

товленной смеси тимола и карвакрола (дозировка искусственной смеси соответствовала проценту содержания тимола и карвакрола в фенольной фракции масла). Оказалось, что фенольная фракция действовала бактерицидно почти в 2 раза эффективнее цельного масла. Так, если масло монарды ингибировало рост микробов в дозе 200—400 мкг/мл, то фенольная фракция оказывала такое же действие в концентрации 125—250 мкг/мл. Бактерицидный эффект этой фракции существенно превышал и противомикробное действие чистых тимола и карвакрола, искусственной смеси тимола и карвакрола. Нефенольная фракция масла монарды и его компоненты (изоборнилацетат, линалилацетат и линалоол) оказались неактивными.

Интересно отметить, что фенольная фракция действовала активнее, чем широко известный антисептик фенол. Результаты наших исследований и эксперименты М. Л. Ханина и соавт. (1968) показали, что фенол угнетает жизнедеятельность микроорганизмов только в дозе, превышающей 1000 мкг/мл. Очевидно, фенольная фракция эфирного масла монарды может с успехом заменить хорошо известные традиционные антисептики фенол и тимол и найти широкое применение в практическом здравоохранении.

Влияние повышенного содержания белка на бактерицидную активность эфирных масел

Известно, что многие антибактериальные препараты, проявляя высокую бактерицидную активность in vitro, резко снижают ее при введении в организм животных или человека. Основная причина этого заключается в блокировании действия антибиотиков белками сыворотки крови [Кашкин П. Н. и др., 1970]. Уменьшение противомикробной активности наблюдается не только у антибиотиков, но и у многих других химических веществ, проявляющих антибактериальный эффект in vitro. Например, основной химический компонент масла монарды тимол при соединении с белками крови теряет свою бактерицидную активность [Eicholts S., 1944]. Учитывая возможность подобных изменений свойств эфирных масел, мы исследовали бактерицидную активность этих веществ при добавлении в питательную среду крови.

Антимикробную активность определяли методом серийных разведений. В опытные пробы добавляли 10% нормальной лошадиной сыворотки. В контрольные пробирки сыворотку не вносили. В качестве

тест-культур использовали St. aureus 209 и E. coli O-111. Анализировали эфирные масла монарды, базилика, эвкалипта и лавра.

Бактерицидная активность эфирных масел в питательной среде с повышенным содержанием белка в большинстве случаев не снижалась. Так, St. aureus 209 в опытных и контрольных пробах погибал при почти одинаковой концентрации масел монарды (250 мкг/мл) и базилика (200 мкг/мл), а E. coli O-111 — при дозах масел монарды и эвкалипта, равных соответственно 200 и 1000 мкг/мл. Бактерицидная концентрация эфирных масел лавра и эвкалипта в среде с повышенным содержанием белка для St. aureus 209 возрастала соответственно в $1^1/_2$ и 2 раза, а масла базилика для E. coli O-111 увеличивалась в $1^1/_2$ раза. Однако такое повышение бактерицидной концентрации не является существенным, поскольку известно, что активность многих антибиотиков (например, хлортетрациклина, синтомицина, полимиксина и др.) в среде с белками сыворотки крови резко снижается — 10—36% от их активности in vitro [Кашкин П. Н. и др., 1970].

Таким образом, установлено, что введение эфирных масел в среду с повышенным содержанием белка незначительно отражается на их бактерицидной активности. Это выгодно отличает масла от других антимикробных препаратов, которые в среде с белками сыворотки крови существенно снижают эффективность своего действия.

Противомикробная активность различных сочетаний эфирных масел и их фракций

Известно, что применение многих комбинаций лекарственных веществ позволяет повышать эффективность их действия и снижать вводимую в организм дозу каждого препарата в отдельности. Учитывая это, мы исследовали бактерицидную активность различных сочетаний эфирных масел с целью выявления возможного синергизма в их действии на микроорганизмы.

Противомикробиую активность определяли методом серийных разведений. Бактерицидное действие комбинаций эфирных масел изучали на тест-культуре St. aureus 209. В экспериментах использовали 5 эфирных масел (монарды, базилика, эвкалипта, кориандра, гладыша) и основную фракцию эфирного масла лаванды — линалилацетат.

Было выявлено, что активным бактерицидным действием обладали 9 сочетаний эфирных масел. Из них наибольший противомикробный эффект проявляли сочетания

базилика с кориандром и базилика с линалилацетатом. Так, отдельно испытанные масло кориандра и линалилацетат подавляли рост тест-культуры в дозе 3000 мкг/мл, т. е. относились к числу малоактивных веществ. Добавление к ним масла базилика в дозе 1000 мкг/мл усиливало бактерицидное действие масла кориандра и линалилацетата в 30 раз. Бактерицидная концентрация смеси двух масел составила 200 мкг/мл. Таким образом, эти вещества переходили из ряда малоактивных соединений в состав активных препаратов. В то же время концентрация масла базилика снизилась в 2 раза и равнялась 100 мкг/мл.

Повышение противомикробного эффекта особенно важно для линалилацетата. Экспериментально установлено, что это вещество является хорошим спазмолитическим средством [Богуцкий Б. В. и др., 1981] и перспективно для лечения бронхиальной астмы и неспецифических воспалительных заболеваний легких с астматическим компонентом. Вместе с тем известно, что в этиологии этих болезней большую роль играют микроорганизмы. Следовательно, сочетание линалилацетата с эфирным маслом базилика можно использовать не только как спазмолитическое средство, но и как противомикробное вещество, при этом с незначительной концентрацией линалилацетата и масла базилика.

Бактерицидная доза последующих 6 сочетаний эфирных масел была выше бактерицидной концентрации смеси масла базилика с маслом кориандра и линалилацетата и составляла 400 мкг/мл. Среди этих сочетаний представляют интерес комбинации эфирного масла эвкалипта с маслами монарды и базилика. Эфирное масло эвкалипта широко используется в медицине в виде ингаляций для лечения неспецифических воспалительных заболеваний легких. Однако это масло обладает слабым противомикробным действием. Добавление к эфирному маслу эвкалипта масел монарды или базилика повышает его бактерицидный эффект в 20 раз и переводит в состав активных противомикробных средств, что имеет важное значение для практического здравоохранения.

Анализ состава активных противомикробных смесей эфирных масел и их фракций показал, что во все испытанные сочетания масел входят масла базилика и монарды. Каждое из них само по себе обладало выраженным бактерицидным действием (бактерицидная концентрация 200 мкг/мл). Очевидно, именно эфирные масла базилика и монарды и обусловливают высокий бактери-

цидный эффект активных смесей масел. В этой связи представляется целесообразным рекомендовать использование добавок эфирных масел базилика и монарды к новым лечебным составам с целью повышения их противомикробной активности. Однако смешивание масел базилика и монарды между собой снижает их антибактериальную эффективность в 2 раза (бактерицидная концентрация возрастает с 200 до 400 мкг/мл). Следовательно, при разработке новых лечебных комбинаций эти масла должны включаться в состав препарата только раздельно: или масло монарды, или масло базилика.

Другие испытанные сочетания эфирных масел, хотя и повышали свою эффективность в 3—8 раз, очевидно, не имеют большого практического значения, поскольку обладают слабым антибактериальным действием.

Таким образом, эфирные масла монарды и базилика значительно повышают бактерицидную активность других эфирных масел, что дает возможность использовать эти вещества в медицине в качестве бактерицидных препаратов.

Формирование устойчивости микроорганизмов к эфирным маслам и антибиотикам

В настоящее время одной из актуальных задач здравоохранения является борьба с развитием лекарственной устойчивости у бактерий. Установлено, что стафилококки нечувствительны к пенициллину в 60—80,8%, к тетрациклину и доксициллину в 23,9—62% случаев [Брусиловский Б. М. и др., 1976; Lenis S. A. et al., 1976, и др.]. Более 60% стрептококков группы А устойчивы к тетрациклину, хлорамфениколу, эритромицину и линкомицину [Maruyama S. et al., 1976]. Протей в 90—100% случаев резистентен к полимиксину, линкомицину, тетрациклину и олеандомицину, в 64,2—75,5% случаев — бензилпенициллину, ампициллину, левомицетину и стрептомицину [Кимельблат М. А. и др., 1976].

В проведенных нами многочисленных наблюдениях установлено, что в течение 11 лет (1972—1982 г.) количество устойчивых и малочувствительных культур кокковидных форм бактерий и грамотрицательных палочек существенно возросло. Так, пиогенный гемолитический стафилококк в 55,9—94% случаев формировал устойчивость к пенициллину, в 38,5—92% — к ристомицину, в 20,7—84% — к тетрациклину, в 13,1—68% — к олеандомицину и в 12,4—

78% случаев — к эритромицину. Грамотрицательные палочки в сравнении с кокковидными культурами проявляли более выраженную резистентность к антибиотикам. Так, кишечные палочки в 26,8—36% случаев были устойчивы к эритромицину, в 32,6—98% — к пенициллину, в 31,5—98% — к олеандомицину и в 50—100% случаев — к ристомицину. Палочки протея, клебсиеллы пневмонии и синегнойные палочки были в большей степени резистентны к антибиотикам, чем кишечные палочки. Например, в 1974, 1981 и 1982 гг. практически все выделенные культуры синегнойной палочки проявляли устойчивость к пенициллину, а в 1980 г.— и к тетрациклину. Ретроспективный анализ результатов исследований выявил, что к 1982 г. количество резистентных штаммов грамотрицательных палочек, так же как и кокковидных форм бактерий, резко возросло. По сравнению с 1972 г. к 1982 г. наблюдалось также существенное повышение числа полирезистентных штаммов. Процент пиогенных стафилококков, устойчивых к 4—6 препаратам, увеличился с 48,1 до 76,5, эпидермальных стафилококков — с 49,9 до 69,3, грамотрицательных палочек — с 31,3 до 75,6. Причем возрастание этих показателей у стафилококков обусловливалось повышением числа культур, малочувствительных к антибиотикам, а у грамотрицательных палочек, кроме того, за счет увеличения числа штаммов, полностью устойчивых к 4—6 препаратам.

В этой связи представляется актуальным изыскание новых видов антибактериальных препаратов, не способствующих развитию резистентности бактерий. Такими перспективными веществами, по нашим наблюдениям, могут быть некоторые виды эфирных масел высших растений. Мы провели исследования с целью изучения динамики формирования устойчивости бактерий к эфирным маслам. Для сопоставительного анализа параллельно определяли скорость возникновения резистентности микробов к широко используемым антибиотикам — стрептомицину и пенициллину.

В экспериментах 18-часовую культуру микроорганизмов засевали в количестве 0,1 мл в МПБ с возрастающей концентрацией эфирных масел или антибиотиков. Через 18 ч инкубирования при 37 °С учитывали максимальную концентрацию антимикробного агента, при которой еще наблюдался рост микробов. Из этой пробирки опять производили высев в пробирки с последующими возрастающими концентрациями эфирных масел или антибиотиков. Каждая культура подвергалась в среднем 16—37 пересевам.

Формирование устойчивости оценивали по отношению максимальной концентрации антимикробного агента при последнем пассаже к

исходной макснмальной концентрацнн (ннднекс увеличения резнстеитности). Ииаче говоря, практнчески учитывалн, во сколько раз увелнчнвается макснмальная переиосимость даниым штаммом мнкроорганнзма концентрацин антнмнкробиого агеита. В качестве тест-культур нспользовали 3 штамма мнкроорганизмов: St. aureus 209 (музейный штамм), St. aureus 2178 (культура, выделениая от больного) н E. coli O-111 (культура, выделенная от больного). Формированне устойчнвости микроорганизмов к эфнриым маслам нзучалн иа прнмере эфирных масел монарды н розы. Эти масла былн выбраны в связн с тем, что первое обладает выраженным протнвомикробным действием, а второе шнроко нспользуется (особенио в Болгарнн) для прнготовлеиня меднцинских препаратов. Эфирные масла моиарды и розы являются однимн нз наиболее перспективиых масел для прнменеиия в практнческом здравоохраиеиин.

Мы обнаружили, что при пассировании микроорганизмов в средах с эфирными маслами их резистентность к маслам повышалась в $2{,}77 \pm 0{,}85$ — $5{,}81 \pm 0{,}5$ раза. При пересевах на средах с антибиотиками устойчивость микроорганизмов возрастала: к пенициллину в $1179 \pm 130{,}4$—$15277{,}8 \pm 1475{,}01$, к стрептомицину — в $58333{,}3 \pm 2525{,}3$—$466319{,}3 \pm 1222{,}83$ раза (разница в высокой степени достоверна).

На рис. 1 показан типичный случай динамики формирования резистентности стафилококка к эфирному маслу монарды и стрептомицину. Исходная бактерицидная концентрация стрептомицина для St. aures 2178 равнялась 0,06 мкг/мл, доза эфирного масла монарды — 195 мкг/мл. Однако уже через 15 пассажей антибактериальная доза стрептомицина возросла в 18 333 раза и составила 11 000 мкг/мл (11 мг/мл), в то время как противомикробная концентрация эфирного масла монарды увеличилась только в 2 раза (390 мкг/мл). Следовательно, после 15 пассажей масло монарды действовало на St. aureus 2178 в 28 раз эффективнее, чем стрептомицин.

В подавляющем числе случаев максимально переносимая бактериями доза антибиотиков через 20—30 пассажей повышалась настолько, что становилась практически равной максимально переносимой концентрации эфирных масел, особенно масла монарды. Эта закономерность четко проявилась при использовании в экспериментах палочковидных форм бактерий. Так, конечная максимально переносимая доза масла монарды для E. coli O-111 через 20 пассажей равнялась $851{,}85 \pm 75{,}2$ мкг/мл (0,85 мг/мл). За этот период времени максимально переносимая доза пенициллина для этого штамма составила $3240{,}0 \pm \pm 1811{,}5$ мкг/мл (3,24 мг/мл), а стрептомицина — $2666{,}6 \pm \pm 8985$ мкг/мл (2,66 мг/мл). Индекс резистентности был

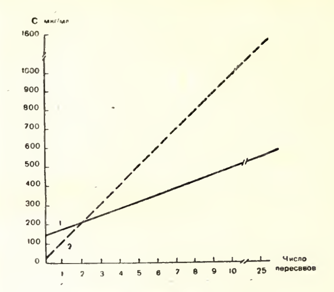


Рис. 1. Динамика формнрования устойчивости золотистого стафилококка 2178 к эфириому маслу моиарды (1) н стрептомициHу (2). По осн ординат — концентрация масла монарды илн стрептомнцнна.

равен соответственно 4,63±0,4; 2969±1475,2 и 120833,3± ±3423,4 ($p<0,0001$).

Итак, полученные нами данные свидетельствуют о том, что микроорганизмы при длительном контакте с эфирными маслами, в частности с маслами монарды и розы, практически не вырабатывают к ним устойчивости. К пенициллину и стрептомицину чувствительность микробов при пассировании их на питательных средах с антибиотиками резко снижается. Медленное развитие резистентности к эфирным маслам является существенным преимуществом БАВ растительного происхождения перед антибиотиками и имеет существенное значение в медицине.

Влияние эфирных масел на мутации бактерий in vitro

В последние годы установлено, что многие химические вещества могут вызывать мутации в генетическом аппарате клеток макроорганизма. Разумеется, такие вещества вредны для человека и использовать их в качестве лечебных препаратов категорически запрещено. В этой связи

мы тщательио исследовали возможиую мутагенную активиость 9 эфирных масел, которые, по иашему мненню, ианболее перспективны для применения в практнческой медицине.

Исследования возможиых мутагенных свойств эфнрных масел были проведеиы иа микроорганизмах. Выбор их в качестве тест-объектов основывался уннверсальиостью природы геиетического кода. Несмотря на то что уровень оргаиизации геиетического материала у микроорганизмов не полностью совпадает с уровием органнзации иаследственного аппарата человека, считается, что действие мутагена в обоих случаях не будет существенно различаться [Legator M. S., 1970]. Вместе с тем общеизвестны преимущества использования бактериальных тестснстем для выявлеиия мутагенов хнмической природы. Этн преимущества обусловлены прежде всего необычайно быстрым размноженнем мнкробных клеток. Прн благоприятных условиях размножение некоторых вндов бактерий происходит со скоростью одно деленне каждые 20—30 мии. Если исходное количество микробов, внесенное в пнтательиую среду, прннять за одну особь, а время одного деления за 30 мин, то за сутки общее количество бактерий составит $139{,}5 \cdot 10^{11}$ клеток [Пяткин К. Д., 1962]. Поэтому в бактериальной тест-системе даже редкие мутацин могут быть быстро обиаружены, поскольку воздействию мутагена иа чашках Петри подвергается около $5 \cdot 10^{8}$ бактерий. Даже если только у иекоторых бактерий образуются в соответствующем нуклеотиде мутации, каждая такая бактерия дает колонню, которую можно обнаружить уже через 2 дня [Ames D. N., 1971].

Мы использовали методику D. N. Ames (1971). Принцип метода заключается в образоваини колоний гистиднизависимой Salmonella typhimurium 1020 на гистидиниесодержащей плотной миннмальной среде после экспозиции с предполагаемым мутагеном. На твердую мииимальиую среду, не содержащую гистидиия, засевали Salmonella typhimurium 1020 и накладывали дискн диаметром 6 мм, смоченные спиртовымн растворами эфирных масел. Исследуемые концентрации масел колебались в диапазоне 30—40 000 мкг/мл. Для сравнеиия в опытах на агар укладывали диски, смоченные бактерицидиымн и суббактерицидиымн дозами пеннциллина и стрептомицина. Контролем служили растворы известных мутагенов — нитрозогуаиндина и 5-бромурацила в дозе 30 мкг/мл. Учитывали также спонтанные мутации бактерий без аппликации дисков с какими-либо веществами. Все культуры инкубировалн в течеиие 48 ч при 37 °С. Результаты учитывали по количеству выросших вокруг дисков колоний.

Оказалось, что индуцнрованные мутантные клеткн наиболее часто возникали вокруг дисков с нитрозогуанндином

и 5-бромурацилом. Так, число колоний вокруг дисков, смоченных нитрозогуанидином, составляло в среднем 25,8±0,5, а вокруг дисков, смоченных 5-бромурацилом — 51,2±0,9. Вокруг дисков, пропитанных эфирными маслами и их фракциями, на гистидиннесодержащей плотной минимальной среде число колоний было меньше (1,5±0,05—1,8±±0,04), чем вокруг дисков с нитрозогуанидином и 5-бромурацилом, и практически не отличалось от числа колоний, вызванных спонтанными мутациями (1,5±0,04, $p>0,05$). В контроле с использованием пенициллина и стрептомицина диски с антибиотиками индуцировали образование мутантных колоний несколько чаще, чем при спонтанном росте (2,5±0,03—2,8±0,03; $p<0,05$) или под действием эфирных масел и их фракций ($p<0,05$), но реже, чем в опытах с нитрозогуанидином или 5-бромурацилом (соответственно 25,8±0,50 и 51,2±0,90; $p<0,01$).

Растворитель эфирных масел этиловый спирт и изотонический раствор хлорида натрия действовали на генетические структуры Salmonella typhimurium 1020 так же, как и эфирные масла.

Таким образом, эфирные масла и их фракции индуцировали мутации у микроорганизмов с такой же частотой, как и при спонтанных мутациях или мутациях, обусловленных воздействием спирта или изотонического раствора хлорида натрия. Это свидетельствует о том, что эфирные масла и использованные в экспериментах их фракции в отличие от известных мутагенов нитрозогуанидина и 5-бромурацила не вызывают изменений в генетическом аппарате микробных клеток, т. е. не обладают мутагенным действием.

Сочетанное действие эфирных масел и антибиотиков

Разработка способов повышения эффективности лечебного действия антибиотиков является важной и актуальной проблемой практического здравоохранения. Перспективным направлением в решении этой задачи представляется поиск различных сочетаний лекарственных веществ, повышающих активность антибиотиков.

С целью выявления возможного синергизма действия антибиотиков и эфирных масел мы провели изучение сочетанного действия этих веществ на микроорганизмы.

Исследование проводили на наиболее распространенном представителе условно-патогенной микрофлоры — St. aureus 209 и L-форме стрептококка 406 (выбор этого вида микроорганизмов обусловлен вы-

сокой устойчивостью L-форм бактерий к антибиотикам, например, к препаратам пеницнллннового ряда).

На St. aureus 209 воздействовалн раздельно н сочетанно стрептомицином и эфирным маслом монарды (стрептомицин часто употребляется в клинике для ингибирования стафилококковой инфекции, а из всех исследованных эфирных масел на стафилококк наиболее эффективно действовало масло монарды). На L-форму стрептококка 406 воздействовали тетраолеаном, эритромицином и эфирным маслом базилика (эти вещества наиболее активно подавляли рост L-формы стрептококка).

Установлено, что сочетанное применение эфирного масла монарды и стрептомицина повышало эффективность действия стрептомицина в 4 раза (табл. 3). Аналогичным образом возрастала активность сочетаний эфирного масла базилика с тетраолеаном и эритромицином. Наиболее выраженным действием на L-форму стрептококка 406 обладала комбинация масла базилика с эритромицином. В этом случае бактерицидная концентрация эфирного масла базилика снижалась в 2 раза, а эритромицина — в 10 раз. Бактерицидная концентрация базилика и тетраолеана в смеси уменьшалась соответственно в 2 и 4 раза.

Таблица 3. Бактерицидная концентрация (мкг/мл) сочетаний эфирных масел и антибиотиков

Сочетание масел и антибиотиков	Тест-культура	Бактерицидная концентрация	
		отдельно масел и антибиотиков	сочетаний масел и антибиотиков
Масло монарды и стрептомицин	St. aures 209	200 0,48	200 0,12
Масло базилика и эритромицин	L-форма стрептококка 406	100 0,2	50 0,02
Масло базилика и тетраолеан	То же	100 2,0	50 0,5

Приведенные данные свидетельствуют о том, что эфирные масла и антибиотики проявляют синергизм в виде потенцирования эффектов противомикробного действия. Это явление имеет существенное значение для клинической практики, поскольку дает возможность не только повысить активность антибиотиков, но и снизить их дозы.

Глава 2

ДЕЙСТВИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Действие на культуральные свойства микроорганизмов

Разработка новых противомикробных препаратов включает в себя всестороннее изучение действия этих веществ на микроорганизмы. Проведение подобных исследований связано не только с расшифровкой механизма воздействия препаратов на микробную клетку, но и с выявлением возможных негативных последствий широкого использования этих средств в клинике. Известно много примеров формирования у микроорганизмов под действием лечебных препаратов новых видоизмененных свойств. Использование необоснованно низких дозировок терапевтических веществ способствует селекции бактерий с появлением культур, имеющих неизвестные ранее для них признаки и повышенную вирулентность. Идентификация таких микроорганизмов и методы борьбы с ними являются порой сложными и длительными.

В этой связи нами проведены исследования действия эфирных масел монарды и розы на культуральные свойства наиболее распространенных представителей банальной микрофлоры человека — стафилококков и кишечных палочек. У стафилококков изучали токсинообразование, у кишечных палочек — ферментную активность и подвижность. В экспериментах использовали методику многократного пассирования бактерий в жидких питательных средах с сублетальными дозами эфирных масел.

Контролем служили эти же микробы, не обработанные эфирными маслами. Через 15—20 пассажей у опытных и контрольных культур стафилококков определяли лецитиназную активность, а также плазмокоагуляцию и гемолиз эритроцитов, а у штаммов кишечных палочек — образование кислоты из маннита, глицерина и инозита, усвояемость цитрата натрия на среде Симанса и подвижность в столбике полужидкого агара. В опытах использовали 11 штаммов микроорганизмов. Из них 7 культур St. aureus (штаммы 209, музейный, 2178, 2172, 2185, 435, 701 и 244 были выделены от больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких) и 4 культуры E. coli (штаммы К-12 и О-111 музейные, № 351 и 503 были изолированы также от больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких).

В результате проведенной работы было установлено, что под действием сублетальной дозы эфирного масла монарды у St. aureus 209, 2178 и 2172 снижалось токсинообразование. Так, штамм 2178 утрачивал способность гемоли-

зировать эритроциты и коагулировать плазму в соответственно 86,1 и 97,5% случаев. Потеря способности продуцировать лецитиназу регистрировалась в 1/3 случаев. Культура штамма 2172 практически полностью теряла способность коагулировать плазму и продуцировать лецитиназу, но гемолизировала эритроциты. У штамма 209 исчезала способность гемолизировать эритроциты и синтезировать лецитиназу. У штаммов 2185, 435, 701 и 244 признаки патогенности не изменялись.

Под действием эфирного масла розы St. aureus 2178 терял свойство плазмокоагуляции в 86,3%, а продуцировать лецитиназу — в 34,5% случаев. У штамма 209 эти свойства не утрачивались.

Длительное пассирование E. coli в средах с эфирными маслами монарды и розы практически не отражалось на биологических свойствах этих микроорганизмов. Исключение составила культура штамма K-12, которая в присутствии масла монарды теряла способность ферментировать глицерин и инозит.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что сублетальные дозы эфирных масел монарды и розы в некоторых случаях способствуют снижению патогенности стафилококков и не изменяют биологические свойства кишечных палочек. Очевидно, широкое использование эфирных масел в клинической практике не будет способствовать селекции видоизмененных форм бактерий, что позволяет рекомендовать эти масла в качестве бактерицидных препаратов.

Действие на мембраны микробных клеток

Мембраны играют в жизни клеток не меньшую роль, чем ядро с его генетическим аппаратом. Среди большого числа клеточных мембран исследованию периферической мембраны уделяется наибольшее внимание, поскольку именно поверхность мембран обеспечивает все контакты клетки с внешней средой. От ее состояния зависит жизнеспособность всей клетки.

При возникновении различного рода патологии (воспалительные процессы, проникновение в клетку патогенных факторов микрофлоры и др.) структура и функциональная активность мембран резко изменяются.

Эффективным методом исследования структуры мембран является метод введения в область активного участка белка специального зонда — небольшой молекулы, ко-

торая реагирует на изменения в микроокружении. Наибольшее применение получил метод флюоресцентных зондов, имеющий ряд избирательных возможностей. С помощью этих зондов можно исследовать транспорт веществ через мембраны и структурные перестройки, связанные с функционированием мембранных систем клеток и тканей. Считается, что зонды связываются с мембраной нековалентно в отличие от «флюоресцентных меток», «сшитых» химической связью [Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е., 1980]. Учитывая высокие разрешающие способности метода флюоресцентных зондов [по Г. Е. Добрецову, 1975], мы использовали его для изучения биологического действия эфирных масел на мембраны бактериальных клеток. В экспериментах использовали эфирное масло монарды, поскольку это масло обладает наиболее выраженным бактерицидным действием и перспективно для применения в медицине.

Тест-объектом служила культура стаидартного штамма E. coli O-111. Из 18-часовой культуры готовили по стаидарту мутиостн (500 млн. клеток на 1 мл) взвесь клеток в изотоиическом растворе хлорида иатрия и воздействовалн на иее эфириым маслом моиарды в коиечной коицеитрации масла в среде, равиой 1, 10, 400 н 12 500 мкг/мл. Взвесь виосилн по 0,1 мл в каждое разведение масла моиарды и иикубировали в термостате в течение 2 ч при 37 °C. После иикубации микробиую взвесь трижды цеитрифугнровали прн 3000 об/мии в забуфереииом изотоническом растворе хлорида иатрия в течение 15 мии. На специальиую пластиву нз органического стекла в ячейки одиыакового объема (0,3 мл) виосили по 0,15 мл отмытой взвеси и флюоресцирующего краснтеля 3-метокснбензаитроиа с поглощеинем в областн 420 им и флюоресцеиции 540 нм (положеиие максимума) [Красовицкий Б. М., Болотии Б. М., 1976; Добрецов Г. Е. н др., 1977].

Коитролем служила взвесь бактерий аналогичной коицеитрации без обработки маслом моиарды. Исследоваиия проводили иа микрофлюорнметре. Интеисивиость свечения флюоресцеитных зоидов измеряли в отиосительных едииицах (ОЕ).

Оказалось, что при обработке микроорганизмов эфирным маслом монарды в концентрации 12 500 мкг/мл наблюдалось резкое повышение свечения флюоресцентных зондов (ФЗ). Так, если в контроле (без масла монарды) интенсивность флюоресценции равнялась 4,22±0,54 ОЕ, то при обработке маслом монарды эта величина возросла до 9,30±0,51 ОЕ ($p<0,001$; рис. 2). Повышение интенсивности свечения могло возникнуть в результате неспецифической реакции или деструкции мембран. Для уточнения этого вопроса были произведены контрольные высевы бактерий на МПА. Оказалось, что через 48 ч инкубации при 37 °C рост микробов на МПА отсутствовал. Следовательно,

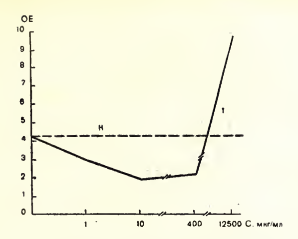


Рис. 2. Измененне интенснвностн флуоресценцни 3-метокснбензантрона после воздействня на мнкроорганнзмы эфнрным маслом монарды (1):

К — контроль (исходный уровень). По оси абсцисс — концентрацня эфнрного масла, по оси ординат — интенсивность свечення ФЗ.

высокую интенсивность свечения флюоресцентных зондов можно объяснить только выраженной деструкцией мембран микробных клеток, при которой нарушается целостность мембраны, зонд выходит за пределы места фиксации и возрастает интенсивность его флюоресценции [Six H. et al., 1974; Smdarsky M. et al., 1977].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что механизм действия бактерицидных доз эфирного масла монарды на микроорганизмы заключается в деструкции мембранных структур микробных клеток с последующими нарушениями внутриклеточного метаболизма и гибелью бактерий.

Представляет определенный интерес взаимосвязь между интенсивностью свечения микробной взвеси и концентрацией эфирного масла монарды. Так, при обработке микробов маслом в дозе 1 мкг/мл интенсивность свечения флюоресцентных зондов равняла 3,0±0,12 ОЕ, что было достоверно меньше флюоресценции в контроле (4,22±±0,54 ОЕ, $p<0,05$). Увеличение концентрации эфирного масла монарды до 10 мкг/мл способствовало еще более выраженному снижению свечения красителя (1,82±0,12 ОЕ, $p<0,01$). Эти данные свидетельствуют о том, что низкие дозы масла монарды уменьшают проницаемость мембран

микробных клеток, в результате чего снижается выход красителя из клеток и его свечение гаснет. H. Six и соавт. (1974) показали, что динамика проницаемости флюоресцентных зондов совпадает с таковой других веществ, активно участвующих в метаболизме клеток (например, глюкозы). Очевидно, что снижение проницаемости клеточных мембран затрудняет транспорт через мембраны не только флюоресцентных зондов, но и других веществ, необходимых для жизнедеятельности микроорганизмов. В то же время контрольные высевы культур на МПА показали, что гибель микробов при концентрации эфирного масла монарды 1—10 мкг/мл не наблюдается. Это свидетельствует о том, что низкие концентрации эфирного масла снижают внутриклеточные обменные процессы, переводя уровень жизнедеятельности бактерий в состояние «микробного анабиоза».

Повышение концентрации масла монарды до 400 мкг/мл практически не изменяло интенсивности свечения флюоресцентных зондов. Так, если при дозе масла 10 мкг/мл флюоресценция зондов равнялась $1{,}82 \pm 0{,}12$ ОЕ, то при концентрации 400 мкг/мл — $2{,}1 \pm 0{,}14$ ОЕ ($p > 0{,}05$). Однако тенденция к нормализации кинетики выхода веществ из клетки уже намечалась. Следовательно, диапазон концентраций 10—400 мкг/мл является оптимальным для снижения внутриклеточного метаболизма E. coli O-111.

Приведенные выше данные имеют не только теоретический интерес, раскрывая особенности механизма биологического действия эфирных масел на микроорганизмы, но и могут быть использованы в практических целях, например при конструировании новых высокоэффективных вакцин.

Таким образом, эфирное масло монарды в больших концентрациях действует деструктивно на цитоплазматические мембраны микроорганизмов. Низкие дозы масла снижают проницаемость мембран, что, по-видимому, обусловливает уменьшение внутриклеточного обменного процесса.

Действие на дыхание микроорганизмов

В результате проведенных исследований были выявлены особенности биологического действия эфирных масел на цитоплазматические мембраны и метаболизм бактерий. Однако вопрос о влиянии масел на внутритканевое дыхание микробов оставался неизученным. Дыхание микроорганизмов является сложным процессом, который сопровож-

дается выделением энергии, необходимой для синтеза различных органических соединений. Учитывая это, мы исследовали действие эфирных масел на дыхание микробов. При выборе методики для проведения исследований руководствовались следующим. Известно, что большинство патогенных и сапрофитных микроорганизмов являются факультативными анаэробами, т. е. вначале развиваются как анаэробы, расщепляя углеводы путем брожения, затем начинают потреблять кислород и развиваются как аэробы, окисляя продукты брожения (молочную кислоту) до углекислоты и воды. При аэробном дыхании оксидазная система катализирует окислительный процесс путем действия кислорода на водород органического вещества.

Интенсивность процессов аэробного дыхания зависит от возраста культуры, температуры и питательных субстратов. Активно растущая культура потребляет за 1 ч 2500—5000 мл кислорода на 1 мг сухого вещества. Определяя количество кислорода в среде при стандартных условиях, можно косвенно судить о действии тех или иных веществ на активность окислительных процессов в микробной клетке.

Количество кислорода в среде определяли на полярографе ОН-102 (Венгрия). Тест-культурой служила E. coli O-111, обработанная эфирным маслом монарды. Применяли методику К. Ф. Шольца и Д. Н. Островского (1975). В ячейку вносили 2-часовую микробную взвесь в МПБ. Концентрация микробной взвеси равнялась 2 млрд. клеток в 1 мл. В ячейку вносили по 2,9 мл микробной взвеси, определяли поглощение кислорода, затем, продолжая запись этих показателей, добавляли эфирное масло в количестве 500—3500 мкг/мл. Контроль — микробная взвесь в аналогичных концентрациях и 96° этиловый спирт.

Было выявлено, что при внесении во взвесь E. coli O-111 эфирного масла монарды в концентрации 500 мкг/мл интенсивность дыхания бактерий снижалась. Так, скорость утилизации кислорода микробами в среде, не содержащей масла монарды, равнялась 494,54±3,54 нг/мин. При добавлении 500 мкг/мл масла скорость потребления кислорода из среды уменьшалась до 407,98±3,03 нг/мин ($p<0{,}01$). При добавлении еще 500 мкг/мл масла (суммарная концентрация 1000 мкг/мл) интенсивность дыхания бактерий снижалась в 2 раза и скорость поглощения кислорода составляла всего лишь 211,33±2,56 нг/мин ($p<0{,}0001$). Добавление в эту же среду еще 500 мкг/мл эфирного масла (суммарная доза 1500 мкг/мл) полностью блокировало дыхание E. coli.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что эфирное масло монарды замедляет окислительно-восстанови-

тельные процессы в микробных клетках. Однако дозы масла монарды, способствующие снижению потребления кислорода (500 мкг/мл), отличались от концентраций, уменьшающих проницаемость мембран микробных клеток (1 мкг/мл—400 мкг/мл). В то же время известно, что снижение внутриклеточного дыхания прямо взаимосвязано с обменом веществ. По-видимому, это явление можно объяснить различной длительностью воздействия масла монарды на микроорганизмы. Так, при исследовании состояния цитоплазматических мембран с помощью флюоресцентных зондов время обработки взвеси микроорганизмов составляло 2 ч. При изучении дыхания микробов на полярографе изменение интенсивности поглощения кислорода происходило практически одновременно с внесением масла в ячейку. Следовательно, при выявлении эффекта снижения уровня окислительно-восстановительного процесса в клетке разница во времени компенсировалась увеличением концентрации воздействующего агента. Это предположение подтверждалось, с одной стороны, тем, что одномоментное внесение эфирного масла монарды в ячейку полярографа в дозе 1000 и 1500 мкг/мл полностью прекращало поглощение микробами кислорода. С другой стороны, 2-часовое воздействие масла на микроорганизмы в дозе 200 и 400 мкг/мл снижало скорость утилизации кислорода соответственно до $421{,}87 \pm 3{,}65$ и $198{,}56 \pm 2{,}87$ нг/мин ($p < 0{,}01$).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что снижение внутриклеточного дыхания микроорганизмов зависит от концентрации эфирного масла монарды и времени воздействия его на клетки. Эти параметры имеют обратную зависимость. Однако снижение внутриклеточного дыхания могло быть обусловлено не маслом, а его растворителем — этиловым спиртом. Для решения этого вопроса мы определяли интенсивность дыхания микробов при воздействии на них этиловым спиртом. Оказалось, что при внесении в микробную взвесь аналогичных концентраций 96° этилового спирта интенсивность дыхания, наоборот, увеличивалась. Так, если при нормальном процессе дыхания скорость потребления кислорода из среды составила $494{,}54 \pm 3{,}54$ нг/мин, то при добавлении 500 мкг/мл этилового спирта этот показатель возрос до $565{,}60 \pm \pm 2{,}46$ нг/мин ($p < 0{,}001$). Таким образом, этиловый спирт не снижал интенсивности дыхательного процесса в клетках, следовательно, это происходило в результате действия только эфирного масла монарды.

Итак, действие эфирного масла монарды на микробную клетку обусловлено не только снижением проницаемости цитоплазматических мембран и интенсивности метаболизма клеток, ио и уменьшением активности аэробного дыхания микробов. Многостороннее действие сублетальных концентраций масла монарды с различными «точками приложения» (структура, биосинтетические и энергетические процессы) не приводит к гибели, а значительно тормозит внутриклеточный метаболизм, вызывая в конечном итоге состояние «микробного анабиоза». Очевидно, «микробный анабиоз» является защитным приспособлением микроорганизмов, позволяющим им выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Действие различных концентраций летучих фракций эфирных масел в воздухе на микроорганизмы

Действие препаратов растительного происхождения на микроорганизмы является сложным, многосторонним и недостаточно изученным. Известно, что биологическое действие БАВ связано с их концентрацией, временем воздействия, особенностью химического строения, активностью действующего начала [Рощина В. Д., 1981]. Выраженность бактерицидного эффекта этих веществ зависит также от срока их хранения, времени и способа получения и многих других факторов [Тютюнник В. И. и др., 1977; Гукасян А. Б. и др., 1981].

Малые концентрации эфирных масел могут стимулировать рост микробов. Х. Х. Абдуллин (1959) сообщает, что добавлеиие низких концентраций кориандрового масла к питательным средам способствует стимуляции роста золотистого и белого стафилококка, вульгарного протея и кишечной палочки.

Суббактерицидные дозы БАВ вызывают у микроорганизмов резкие морфологические, культуральные и биохимические изменения. Наблюдаются снижение или полная потеря вирулентности, изменение антигенных свойств [Айзенман Б. Е., 1975, и др.]. Взаимодействуя с белками, БАВ инактивируют ферментные системы, изменяют митохондриальную активность, ингибируют окислительное фосфорилирование, тормозят образование макроэргических связей [Рощина В. Д., 1981]. Под их влиянием изменяется активность дегидрогеназы янтарной кислоты. Этот процесс в свою очередь отражается на всей жизнедеятельности ми-

кробной клетки. Одновременно значительно уменьшается поглощение кислорода [Гураль А. Л., 1950].

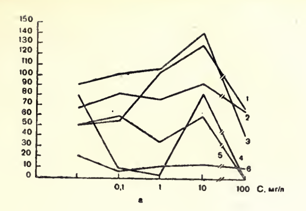
Бактерицидные концентрации эфирных масел вызывают необратимые изменения структуры клеток [Янович Т. Д. и др., 1959; Лесников Е. П. и др., 1959]. Так, электронно-микроскопически установлено, что эфирное масло пихты уже через 3 ч воздействия на St. aureus 209 резко нарушает клеточную стенку и вызывает деструкцию цитоплазматической мембраны [Мовчан Е. А. и др., 1975].

Однако следует отметить, что в большинстве исследований эфирные масла добавляли в питательные среды. Вместе с тем одним из наиболее перспективных направлений использования масел является оптимизация состава воздуха производственных помещений, школ, больниц и т. д., особенно в условиях Крайнего Севера и в зимневесенний период года. Такая оптимизация предусматривает, с одной стороны, целебное воздействие БАВ на организм человека, а с другой — снижение количества бактерий в воздухе. Иначе говоря, целесообразно изучить характер действия на микроорганизмы различных доз масел в воздухе и выбрать также их концентрации, которые оказывали бы благоприятное воздействие на макроорганизмы и ингибировали рост микробов и грибов. Мы исследовали действие различных доз масел и их концентраций в воздухе на жизнедеятельность микроорганизмов.

Тест-культурой служили наиболее распространенные представители условно-патогенных микроорганизмов: St. aureus 209, E. coli O-111 и дрожжеподобные грибы рода Candida (Candida micoderma). Эксперименты проводили в анаэростатах. БАВ испаряли в концентрации 0,1; 1; 10 и 100 мг на 1 л воздуха. Исследовали эфирные масла монарды (Monarda fistulosa L.) базилика (Ocimum gratissimum L.), полыни крымской (Artemisia taurica), лаванды (Lavandula vera D. C.), мяты крымской (Mentha taurica L.), лавра (Laurus nobilis), розмарина (Rosmarinum officinalis L.), эвкалипта (Eucaliptus globulus), фенхеля (Foeniculum vulgare Miller), розы (Rosa gallica L.), полыни лимонной (Artemisia balchanorum L.), основную фракцию базилика эвгенольного (Ocimum gratissimum L.), эвгенол и кубовый остаток ладанника (Cistus ladoniferus).

Учет производили по количеству колоний, их диаметру, размеру микробных клеток и проценту делящихся клеток (последнее относится к Candida mycoderma).

Было установлено, что различные дозы масел действовали на тест-культуры неоднотипно. Эфирные масла полыни крымской, розы, розмарина и полыни лимонной в концентрации 0,1 мг/л увеличивали количество колоний St. aureus (рис. 3а). Масло монарды и кубовый остаток ладанника в этой же дозе, наоборот, снижали число ко-



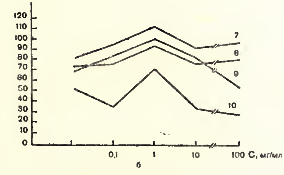


Рис. 3. Изменения количества колоиий золотистого стафилококка при культивировании в атмосфере, содержащей эфирные масла различных растеиий:

а: 1 — роза французская, 2 — розмарин лекарствениый, 3 — полыиь крымская, 4 — монарда дудчатая, 5 — полыиь лнмоиная, 6 — кубовый остаток ладанника; б: 7 — базилик эвгенольный, 8 — эвкалипт шаровидный, 9 — лаванда настоящая, 10 — лавр благородный. По оси абсцисс — концентрации эфирных масел в воздухе, по оси ординат — абсолютное количество колонний.

лоний соответственно с 83,8±1,4 (в контроле) до 10,1±1,5 (в опыте, $p<0{,}001$) и с 22,8±1,4 до 7,4±0,8, ($p<0{,}01$). Однако при повышении концентрации масел до 10 мг/л количество колоний резко возрастало. И только при дозе в 100 мг/л отмечалась ингибиция роста St. aureus. Наиболее четкие результаты были получены при употреблении эфирных масел монарды и полыни лимонной — в этом случае мы не обнаружили ни одной колонии St. aureus.

В отдельную группу выделены эфирные масла базилика, лавра, лаванды и эвкалипта. Эти вещества снижали количество колоний стафилококка в дозе, равной 10 мг/л, и повышали этот показатель в концентрации 1 мг/л (рис. 3б).

Эфирные масла практически во всех случаях уменьшали диаметр колоний. Например, масло монарды в концентрации 1 мг/л ингибировало рост стафилококка, а в дозе 10 мг/л, наоборот, стимулировало его жизнедеятельность. Однако диаметр колоний был во всех опытах меньше, чем в контроле (соответственно $0,79\pm0,063$ мм; $1,05\pm0,006$ мм; $1,12\pm0,012$ мм, $p<0,01$). А эфирное масло полыни крымской в концентрации 10 мг/л повышало количество колоний стафилококка ($139,6\pm2,1$ в опыте против $90,5\pm1,6$ колоний в контроле; $p<0,001$). В то же время средний диаметр колоний в опыте равнялся $1,0\pm0,006$ мм, а в контроле — $1,51\pm0,012$ мм ($p<0,001$). В дозе 100 мг/л это масло уменьшало количество колоний до $53,0\pm2,9$ ($p<0,001$), а диаметр — до $0,5\pm0,002$ мм ($p<0,0001$). Аналогичные данные были получены и в опытах с другими маслами. Исключение составляло эфирное масло базилика, которое в концентрации 0,1 и 1 мг/л увеличивало диаметр колоний, а в дозе 10 и 100 мг/л воздуха не изменяло анализируемых величин.

Размеры клеток стафилококков, культивируемых в атмосфере с добавками БАВ, в большинстве случаев не менялись. Так, размер клеток St. aureus без воздействия БАВ составлял $0,85\pm0,016$ мкм, а при культивировании в атмосфере с эфирным маслом розмарина в дозе 0,1 мг/л — $0,83\pm0,011$ мкм, в дозе 1 — 100 мг/л — $0,85\pm0,011$ мкм ($p>0,05$). При добавлении эфирного масла фенхеля размеры клеток варьировали в пределах $0,84\pm0,012$—$0,85\pm0,011$ мкм, что не отличалось от контроля ($0,85\pm0,016$ мкм, $p>0,05$). Такая же картина наблюдалась и при добавках других масел. Исключением были эфирные масла розы и полыни лимонной — они достоверно уменьшали размер клеток. Такая же картина наблюдалась при воздействии на микроорганизмы сублетальных концентраций эфирных масел монарды (доза 10 мг/л), базилика и полыни крымской (доза 100 мг/л).

При изучении действия БАВ на жизнеспособность E. coli было установлено, что динамика показателей у этих микроорганизмов менее выраженная, чем у St. aureus. Наиболее интересные данные получены при воздействии на E. coli эфирных масел фенхеля, эвкалипта, розмарина и

базилика. Эти масла в дозе 1—100 мг/л существенно повышали количество колоний. Так, если в контроле было обнаружено 126,0±3,1 колоний, то под действием масла фенхеля в дозе 1 мг/л этот показатель возрос до 190,0±3,9, при дозе 10 мг/л — до 222,4±2,4 колонии, при 100 мг/л — до 437,6±3,1 ($p<0,001$). Подобные результаты были получены и в экспериментах с маслами розмарина, базилика и эвкалипта, и, хотя при последовательной обработке эфирным маслом эвкалипта в концентрациях 10 и 100 мг/л количество колоний E. coli уменьшалось с 198,5±3,9 до 153,8±2,1, последняя величина все же достоверно превышала контрольные показатели (126,0±3,1, $p<0,001$). Поскольку E. coli на контрольные и опытные чашки высевали из одного разведения (среднее количество повторностей 40), можно предположить, что эфирные масла фенхеля, эвкалипта, розмарина и базилика каким-то образом резко повышают выживаемость E. coli. Несмотря на то что механизм описанного явления пока изучен недостаточно, приведенные данные могут быть использованы в практике для разработки способа стимуляции роста биомассы E. coli (например, для получения вакцин или микробных антигенов).

Остальные эфирные масла были отнесены во вторую группу: масла монарды, полыни крымской, лаванды, розы, мяты, лавра, полыни лимонной и кубовый остаток ладанника. Масла этой группы в зависимости от величины применяемых концентраций БАВ умеренно стимулировали или ингибировали жизнедеятельность бактерий. Очевидно описав стимулирующее действие эфирных масел на микроорганизмы, необходимо остановиться и на ингибирующей роли этих БАВ. Мы зарегистрировали, что достоверно число колоний E. coli снижалось под действием эфирных масел монарды, полыни крымской, лаванды и мяты в дозе 0,1 мг на 1 воздуха; эфирных масел лаванды, монарды, лавра — в дозе 1 мг/л; эфирных масел полыни крымской, розы, полыни лимонной — в дозе 10 мг/л и масел полыни крымской, монарды, полыни лимонной, лаванды и кубового остатка ладанника — в дозе 100 мг/л.

Исследование действия эфирных масел на размер колоний E. coli показало, что их диаметр практически во всех опытах был меньше, чем в контроле. Например, если диаметр колоний в контроле равнялся 2,43±0,034 мм, то при воздействии эфирного масла монарды он уменьшался до 1,75±0,044—2,15±0,022 мм ($p<0,01$). Наиболее мелкие колонии образовывались при концентрации масел, равной

100 мг/л. Исключение составляли эфирные масла лаванды и розмарина: в первом случае под их действием диаметр колоний увеличивался с $2,08\pm0,025$ мм (контроль) до $2,1\pm0,024$—$2,76\pm0,051$ мм, а во втором случае не было обнаружено достоверного уменьшения диаметра колоний.

Размер клеток E. coli, культивируемых в атмосфере с эфирными маслами, во всех исследованиях имел тенденцию к уменьшению. Однако достоверные результаты были получены только при действии эфирного масла полыни лимонной и кубового остатка ладанника. В этом случае средняя величина клеток составила: в контроле $1,53\pm0,037$ мкм, в опыте $1,40\pm0,022$—$1,44\pm0,025$ мкм ($p<0,05$).

При изучении действия эфирных масел на дрожжеподобные грибы рода Candida все эти БАВ были распределены на две группы. В 1-ю группу мы включили эфирные масла полыни крымской, лавра, мяты, розмарина, эвкалипта, розы и основную фракцию базилика эвгенол. Эфирные масла этой группы в концентрации 0,1 мг/л практически не влияли на количество колоний. Достоверное увеличение числа колоний грибов регистрировалось только при действии масла розмарина ($85,75\pm3,6$ в контроле и $100,75\pm3,9$ в опыте, $p<0,05$). Повышение дозы масел до 1 мг/л во многих случаях способствовало существенному повышению количества колоний. Наиболее значительный эффект наблюдался при действии эфирных масел полыни крымской, розмарина и эвкалипта. Так, под влиянием масла полыни крымской в дозе 1 мг/л количество колоний увеличилось в 3 раза ($54,0\pm1,29$ в контроле, $147,8\pm5,3$ в опыте, $p<0,001$). Аналогичные результаты были получены при использовании масел розы и эвкалипта. Тенденция к возрастанию числа жизнеспособных клеток наблюдалась и при действии эфирного масла лавра. Однако эти данные были статистически недостоверными.

Повышение концентрации эфирных масел до 10 мг/л вызывало негативную реакцию: эта доза снижала количество жизнеспособных клеток в сравнении с предыдущей концентрацией (за исключением эвгенола). Но несмотря на четко выраженную закономерность снижения числа колоний от этих доз БАВ, все же анализируемые показатели оставались выше контрольных величин. И только в дозе 100 мг/л эфирные масла в большинстве случаев активно ингибировали рост микроорганизмов. Особенно эффективным оказалось действие масла эвкалипта: количество колоний уменьшалось с $103,25\pm11,9$ до $14,8\pm2,2$ ($p<0,0001$).

Отсутствие эффекта выявлено только при действии масла полыни крымской и эвгенола.

Во 2-ю группу были отнесены эфирные масла монарды, базилика, лаванды, фенхеля, полыни лимонной и кубовый остаток ладанника. Действие масел этой группы оказалось менее выраженным, чем в 1-й группе БАВ. Масла в концентрации 0,1 мг/л в 50% случаев не влияли на количество колоний грибов. Масла базилика и полыни лимонной снижали жизнеспособность клеток, а масло фенхеля, наоборот, повышало. Аналогичную динамику мы наблюдали при действии эфирных масел в дозе 1 мг/л. Дальнейшее повышение концентраций эфирных масел (до 10 мг/л) способствовало снижению количества колоний грибов (масло базилика) и полной ингибиции роста этих микроорганизмов (масло монарды). Эфирное масло лаванды несколько повышало число колоний, а масла фенхеля, полыни лимонной и кубовый остаток ладанника не влияли на этот показатель. В концентрации, равной 100 мг/л, эфирные масла монарды и полыни лимонной подавляли рост грибов, а масла базилика и лаванды существенно снижали количество колоний. Кубовый остаток ладанника не изменял числа колоний. И только масло фенхеля способствовало увеличению этих показателей до $60{,}0 \pm 1{,}0$ (в контроле $17{,}5 \pm 1{,}8$, $p < 0{,}01$).

Площадь колоний дрожжеподобных грибов рода Candida при культивировании в атмосфере с эфирными маслами была, как правило, меньше, чем в контроле. Например, при обработке культуры грибов маслом розмарина в дозе 0,1 мг/л диаметр колоний равнялся $0{,}92 \pm 0{,}012$ мм, в дозе 1 мг/л — $0{,}98 \pm 0{,}008$ мм в дозе 10 мг/л — $0{,}95 \pm \pm 0{,}009$ мм и в дозе 100 мг/л — $0{,}6 \pm 0{,}08$ мм. В контроле этот показатель составлял $1{,}18 \pm 0{,}027$ мм ($p < 0{,}01$). Увеличение размера колоний грибов было выявлено только при действии масла базилика и кубового остатка ладанника. Одновременно мы зарегистрировали уменьшение размера и количества делящихся клеток.

Анализ полученных результатов показал, что все эфирные масла по характеру их действия на жизнеспособность микроорганизмов можно разделить на три основные группы: стимуляторы, индифферентные масла и ингибиторы (табл. 4). Из табл. 4 видно, что из стимулирующих БАВ наиболее эффективно жизнеспособность стафилококков повышают масла полыни крымской, розы и фенхеля. Рост E. coli активно стимулируется маслами фенхеля и розмарина. На дрожжеподобные грибы рода Candida хорошо

Таблнца 4. **Действие эфириых масел различиых растеиий на микроорганизмы (учет по количеству колоний)**

Тест-культура	Растение	Действующие концентрации, мг/л
	Стимуляторы	
St. aureus 209	Полыиь крымская	0,1—10
	Фенхель обыкновениый	0,1—100
	Роза французская	0,1—100
	Базилик эвгенольиый	0,1—1
	Лаваида настоящая	1—10
	Розмарии лекарственный	0,1—10
	Эвкалипт шаровндный	1
E. coli	Фенхель обыкновеииый	1—100
	Розмарии лекарственный	100
	Базилик эвгенольный	0,1—10
	Эвкалипт шаровидный	1—100
Candida mycoderma	Полыиь крымская	1
	Фенхель обыкновеиный	100
	Розмарии лекарственный	0,1—100
	Фракция масла базилика эвгеиольного (эвгенол)	1—100
	Индифферентные масла	
St. aureus 209	Мята крымская	1—10
E. coli O-111	Мята крымская	1—100
	Лавр благородный	10—100
	Роза французская	10—100
	Кубовый остаток ладаиника	0,1—10
Candida mycoderma	Мята крымская	0,1—1
	Лавр благородиый	0,1—10
	Кубовый остаток ладаиника	0,1—100
	Ингибиторы	
St. aureus 209	Моиарда дудчатая	01—1; 100
	Полыиь лимонная	100
	Лавр благородный	0,1; 10—100
	Кубовый остаток ладаиника	0,1—100
E. coli O-111	Мята крымская	100
Candida mycoderma	Моиарда дудчатая	0,1; 100
	Полыиь лимонная	10—100
	Полыиь крымская	10—100
	Лаваида настоящая	0,1—1; 100
	Моиарда дудчатая	10—100
	Полыиь лимонная	0,1—100
	Базилик эвгенольиый	0,1—100
	Мята крымская	10—100
	Лаваида настоящая	100
	Эвкалипт шаровидный	100
	Роза французская	100

воздействуют масла полыни крымской, розмарина и фенхеля. По спектру действия на микроорганизмы выделяются эфирные масла фенхеля и розмарина. Эти вещества активно повышают жизнеспособность кокковидных и палочковидных микробов, а также грибов рода Candida. Индифферентные масла проявляют маловыраженное действие на микроорганизмы: масла мяты крымской (по действию на стафилококки), кубовый остаток ладанника, масла лавра, мяты крымской и розы в различных концентрациях (по действию на E. coli и дрожжеподобные грибы). В группу ингибирующих веществ были включены эфирные масла монарды, мяты крымской (действие на стафилококки и грибы), полыни лимонной и др. Наиболее активным противомикробным действием обладали масла монарды и полыни лимонной. Однако использование этих масел по отдельности имеет ряд недостатков. Так, эфирное масло монарды в дозе 100 мг/л воздуха обладает резким трудно-переносимым запахом, а в более низких дозах оно не всегда эффективно. Полынь лимонная распространяет приятный аромат, но ее ингибирующие концентрации, так же, как и масла монарды, высоки и недостаточно активны в отношении E. coli. На палочковидные бактерии хорошо действует масло монарды. В этой связи мы использовали композицию веществ, состоящую из равных частей эфирных масел монарды и полыни лимонной. Оказалось, что в таком сочетании масла обладают приятным легкопереносимым запахом, эффективно действуют на все три вида микроорганизмов и могут быть использованы для снижения количества бактерий и грибов в закрытых помещениях.

Таким образом, эфирные масла в зависимости от своего состава и концентрации действуют на микроорганизмы разнонаправленно. Одни из них проявляют стимулирующее действие, другие — ингибирующее, а третьи (индифферентные масла) не оказывают существенного влияния на жизнеспособность клеток. Очевидно, при применении эфирных масел в практических целях, например для получения больших количеств биомассы микроорганизмов (стимуляторы) или для снижения бактериальной обсемененности воздуха (ингибиторы), необходимо учитывать характер действия этих веществ и тщательно подбирать их концентрации. Независимо от характера действия БАВ и их концентраций в подавляющем большинстве случаев они уменьшают размер колоний микроорганизмов. Отмечена и тенденция у некоторых видов бактерий и грибов уменьшать

размеры и количество делящихся клеток в атмосфере с БАВ. Эти данные согласуются с результатами исследований действия масел на мембраны и дыхание микробных клеток и подтверждают предположение о том, что в среде с БАВ растительного происхождения у микроорганизмов снижается внутриклеточный метаболизм и они находятся в состоянии так называемого микробного анабиоза.

Глава 3

ДЕЙСТВИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА КУЛЬТУРЫ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Значительной проблемой в изучении БАВ растительного происхождения, в частности эфирных масел, является их большое разнообразие и как следствие этого — трудность выбора какого-либо определенного вещества для детального, углубленного анализа. Поэтому одной из основных первоначальных задач в исследовании эфирных масел является их скрининг, т. е. отбор для дальнейшего подробного изучения на основании результатов, полученных с помощью каких-либо простых, доступных и недорогих методов.

Поскольку медицинское значение фитонцидов, как принято считать, в основном заключается в их антибактериальном действии, предварительный их отбор также часто ограничивается исследованием антибактериальной активности в пробирочных опытах. Это представляется несомненно правомерным, особенно в тех случаях, когда речь идет преимущественно о выборе новых антибактериальных препаратов. Вместе с тем известно, что многие БАВ, в частности фитонциды, активно действуют и на организм человека, влияя на самые разнообразные органы и системы. Таким образом, для полноценного предварительного отбора, скрининга БАВ растительного происхождения представляется весьма важным и изучение особенностей их воздействия на культуры соматических клеток. Эти объекты достаточно доступны, относительно недороги и в зависимости от поставленной задачи состояние их может быть довольно адекватно оценено с той или иной стороны. К тому же исследования на клеточных объектах позволяют не только выявить наиболее активные эфирные масла, но и определить примерный диапазон их действующих концентраций.

На культурах клеток мы изучали как уже выбранные по наибольшей антибактериальной активности эфирные масла, так и недостаточно активные вещества. Сочетание высокой антибактериальной активности и способности действовать в минимальных концентрациях на культуры соматических клеток явилось основанием для дальнейшего изучения эфирных масел в опытах in vivo, требующих большого количества экспериментальных животных и достаточно трудоемких. Данный подход в значительной степени себя оправдал: в опытах на экспериментальных животных практически все эти эфирные масла показали высокую биологическую активность.

Действие на проницаемость клеточных мембран

Значение состояния цитоплазматических мембран для жизнедеятельности отдельной клетки, клеточных систем, различных органов и организма в целом переоценить трудно. Посредством мембранного транспорта осуществляются питание клеток, взаимосвязь клеток между собой, через мембраны опосредуются рецепторные взаимодействия и тем самым осуществляется регуляция жизнедеятельности клетки, выполнение клетками разнообразных присущих им функций, размножение клеток и др. Равным образом состояние мембран часто определяет направленность течения того или иного патологического процесса, его исходы и др. Таким образом, в предварительном исследовании эфирных масел представлялось чрезвычайно важным оценить их влияние на цитоплазматические мембраны.

По мнению В. Д. Рощиной и соавт. (1979), фитонциды при действии на клетки изменяют синтез нуклеиновых кислот и белка, вязкость, а также проницаемость цитоплазматических мембран. Е. Л. Авенирова и соавт. (1979) при исследовании молекулярных механизмов действия фитонцидного препарата новоиманина и препарата К установили, что эти фитонциды значительно снижают проницаемость мембран для аминокислот и ряда предшественников нуклеиновых кислот, а также угнетают включение в клетки меченых глюкозы, аминокислот и тимидина (препарат К). Авторы пришли к выводу, что препараты на основе фитонцидов чеснока являются мембраноактивными агентами. Мы исследовали влияние некоторых эфирных масел на проницаемость мембран культур человеческих лимфоцитов.

Проницаемость мембран оценивали по включению в кислотонерастворимое клеточное содержимое меченых предшественников ДНК и РНК, а также по наличию в кислоторастворимом содержимом меченого предшественника белка, а также ^{14}[C]-глюкозы.

Исследования проводили на 24- и 72-часовых культурах лейкоцитов периферической крови человека. Использовали культуры, приготовленные из гепаринизированной крови, содержащие $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл, объем культур составлял 1—2 мл. Культуральную среду приготовляли только на основе коммерческой среды 199 с добавлением аутоплазмы и антибиотиков (пенициллина и стрептомицина) в обычных концентрациях. В каждую культуру добавляли по 1 мкКи меченого предшественника в 0,1 мл среды 199. Культуры инкубировали в течение 24 и 72 ч при 37 °C.

Включение предшественников в клетки оценивали следующим образом. После инкубации клетки отмывали от несвязавшейся метки последовательно уксусной и трихлоруксусной кислотами, после чего осадок подвергали кислотному гидролизу в присутствии 5% трихлоруксусной кислоты на водяной бане при 80 °C в течение 20 мин. Гидролизат заливали диоксан-толуольным сцинтиллятором и определяли радиоактивность образца на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Исследуемые эфирные масла смешивали с дистиллированной водой до концентрации 1% (объем — объем), затем эмульгировали озвучиванием на ультразвуковом дезинтеграторе в течение 3 мин, амплитуда 18—20 мкм. Исходную водо-масляную эмульсию разводили средой 199 до необходимых концентраций и добавляли в культуры лейкоцитов в начале культивирования по 0,1 мл.

Радиоактивность в культурах, инкубированных в присутствии меченых предшественников, выражали в числе импульсов в минуту. Каждую концентрацию эмульсий эфирных масел, а также соответствующие контроли (индивидуальные к каждому опыту) испытывали не менее чем на двух параллельных культурах. Процент ингибиции включения меченых предшественников под влиянием эфирных масел вычисляли путем деления усредненного уровня радиоактивности в культурах с добавлением масла на усредненный показатель радиоактивности соответствующих контрольных культур, умножения полученного частного на 100 и последующего вычитания из 100.

Выяснилось, что 24- или 72-часовое культивирование лейкоцитов периферической крови человека в отсутствие каких-либо стимуляторов сопровождалось определенным спонтанным включением меченых предшественников в кислотонерастворимое клеточное содержимое. Для ^{3}[H]-тимидина этот показатель составил 273±50—1713±558, ^{3}[H]-уридина — 1549±305—12 819±1839, ^{3}[H]-лейцина — 9190±1000 и для ^{14}[C]-глюкозы — 855±52 имп/мин на культуру.

Добавление в культуры лейкоцитов водно-масляной эмульсии эфирного масла монарды дудчатой приводило к подавлению проникновения в клетки меченых предшественников, причем выраженность этого процесса прямо зависела от дозы масла. Так, при конечной концентрации в среде масла монарды 500 мкг/мл включение ^{3}[H]-тимидина

ингибировалось иа 76—93% при 24- и 72-часовой инкубации культур, уменьшение конечной концеитрации масла до 100 мкг/мл сопровождалось снижением изучаемого показателя до 53,4%, а при конечной концентрации, равной 20 мкг/мл,— до 23,8%. Аналогично этому введение масла моиарды в 24-часовую культуру нестимулированных лейкоцитов приводило к дозозависимому угнетению включеиия ^{3}[H]-уридина (95,6% при конечной концентрации в среде 500 мкг/мл и 16,3% при концентрации 20 мкг/мл), ^{3}[H]-лейцина (соответственно 80,0 и 35,6%) и ^{14}[C]-глюкозы (65,2% при концентрации масла в среде 500 мкг/мл).

Увеличение продолжительности контакта водно-масляной эмульсии монарды с клетками в культуре приводило к увеличению подавления включения в клетки ^{3}[H]-тимидина. Так, при концентрации масла в среде, составлявшей 20 мкг/мл, включение предшественника подавлялось на 23,8% при 24-часовом и на 43,3% — при 72-часовом культивировании.

Эфирное масло кориандра, обладающее невысокой антибактериальной активностью in vitro, также подавляло включение ^{3}[H]-тимидина в лейкоциты при культивировании их в течение 72 ч, при этом высокая концентрация кориандра в среде (2,5 мг/мл) приводила к почти полному подавлению включения (на 86,5%), однако концентрация 500 мкг/мл ингибировала включение предшественника всего на 48,6%.

Масло розы снижало проницаемость цитоплазматических мембран лейкоцитов при 72-часовом культивировании на 76,8% при концентрации его в культуре, равной 2,5 мг/мл, на 31—39% при концентрации 250 мкг/мл и практически не влияло на проницаемость мембран в конечной концентрации, составляющей 2 мкг/мл.

Удаление эфирного масла монарды из культуры лейкоцитов перед внесением меченого предшественника практически не влияло на подавление включения предшественников в кислотонерастворимое клеточное содержимое. Так, при внесении ^{3}[H]-тимидина в культуру, инкубированную в течение 65 ч с эфирным маслом монарды в конечной концентрации 500 мкг/мл, а затем тщательно отмытую от среды с маслом, включение предшественника ингибировалось на 80%, при внесении ^{3}[H]-лейцина — на 74,2%, а при внесении ^{14}[C]-глюкозы — 49,4%.

Таким образом, водно-масляные эмульсии таких эфирных масел как масло монарды, кориандра и розы масла при добавлении в культуры нестимулированных лейкоци-

тов периферической крови человека и последующем культивировании в течение 24 и 72 ч подавляли включение в лейкоциты меченых предшественников. Наблюдаемое нами снижение включения в кислотонерастворимое клеточное содержимое отражает, по-видимому, не столько уменьшение активности синтеза ДНК и РНК, сколько изменение проницаемости клеточной поверхности для предшественников [Епифанова О. И. и др., 1977; Plageman R., Roth J., 1969; Weber L., Edein A., 1971].

Кроме того, опыты с удалением из культур эфирного масла монарды перед внесением меченого предшественника показали, что эффект подавления включения при культивировании не зависит от связывания предшественника эфирными маслами в культуральной среде, а заключается, очевидно, в непосредственном действии на клетки.

Итак, снижение включения тимидина и других предшественников в культуры лейкоцитов при действии изученных эфирных масел можно отнести, по-видимому, за счет влияния последних на проницаемость цитоплазматических мембран. Среди изученных нами эфирных масел наиболее активным в этом отношении оказалось масло монарды дудчатой, наименее активным — масло розы, эфирное масло кориандра занимало промежуточное место.

Все изученные масла ингибировали проницаемость цитоплазматических мембран лейкоцитов дозозависимо, более высокие концентрации масел приводили к большему подавлению включения предшественников. Увеличение времени контакта масла с клетками также сопровождалось снижением проницаемости цитоплазматических мембран.

Действие на пролиферативные реакции лимфоцитов

Показано, что БАВ растительного происхождения могут влиять на иммунные реакции организма, т. е. оказывать иммуномодулирующее действие [Бондаренко А. С., 1979; Макарчук И. М., 1979], поэтому значительный интерес представляет поиск таких иммуномодулирующих веществ и среди эфирных масел.

В качестве модели in vitro для отбора потенциальных иммуномодуляторов может быть применена стимулированная пролиферативная реакция лимфоцитов, поскольку пролиферативные процессы играют ключевую роль в развитии практически всех типов иммунного ответа [Петров Р. В., 1982]. По влиянию на пролиферативные реакции лимфоцитов можно, по-видимому, с определенной долей вероят-

ности судить о потенциальных иммуномодулирующих свойствах исследуемого вещества.

Для некоторых БАВ растительного происхождения уже установлена способность действовать на процессы деления и размножения клеток. Так, упоминавшийся выше новоиманин может подавлять синтез нуклеиновых кислот и белка у стафилококка [Авенирова Е. Л. и др., 1979] и в культуре соматических клеток [Рощина В. Д. и др., 1979]. По данным Н. Е. Преображенской (1979), из 60 БАВ полученных из растений, принадлежащих к 24 различным семействам, 6 уменьшали суммарное количество нуклеиновых кислот в культуре опухолевых клеток на 38—74 %, т. е. подавляли активную пролиферацию. Вместе с тем один из растительных противоопухолевых антибиотиков в дозе 25 мкг/мл довольно активно стимулировал пролиферативную реакцию лимфоцитов на фитогемагглютинин (ФГА) [Мишенкова Е. Л., 1985].

Конечно, данные, полученные в опытах in vitro, нельзя полностью переносить в условия in vivo, однако, как уже говорилось, вероятность воздействия на активно делящиеся клетки в организме выше, по-видимому, у тех веществ, которые способны влиять на пролиферативные процессы in vitro.

В качестве тест-снстемы для оценкн действня некоторых эфирных масел мы нспользовалн культуры лимфоцитов человеческой крови, стимулированные полнклоиальиым Т-мнтогеном — ФГА. Культуры лейкоцитов готовили по описаииому выше методу, добавляли в них ФГА-П по 31 мкг иа культуру, содержащую $2 \cdot 10^6$ клеток. Культнвированне проводилн в течение 72 ч. Пролнферативиую реакцию оцеиивалн по ннтеисивиости включеиия ^{3}[H]-тимидииа в кислотонерастворнмое клеточиое содержимое.

Инкубация культур лимфоцитов периферической крови человека с ФГА в указанной концентрации сопровождалась значительной стимуляцией синтеза ДНК. Включение ^{3}[H]-тимидина возрастало по сравнению с нестимулированными культурами лимфоцитов в 40—160 раз и составляло 34 454 ± 1612—154 363 ± 42 344 имп/мин на культуру. Добавление в культуральную среду водной эмульсии эфирного масла монарды сопровождалось практически полным подавлением накопления радиоактивной метки в кислотонерастворимом клеточном содержимом, т. е. ингибицией ФГА-индуцированной реакции бласттрансформации лимфоцитов. Масло монарды в конечной концентрации 2,5—500 мкг/мл ингибировало включение меченного предшественника ДНК в культуру на 99,5—99,95 %. Уменьше-

ние концентрации водно-масляной эмульсии монарды в культурах в 5—25 раз сопровождалось незначительным снижением ингибиции пролиферативной реакции лимфоцитов: до 98,2% при конечной концентрации масла 100 мкг/мл и до 96,9% при конечной концентрации 20 мкг/мл.

Водно-масляная эмульсия эфирного масла кориандра в конечной концентрации 2,5 мг/мл, так же как и масло монарды, полностью подавляла синтез ДНК в культурах лимфоцитов (на 99,9%). Однако уменьшение концентрации в культуральной среде до 500 мкг/мл приводило к существенному снижению ингибиции пролиферативной реакции (до 79%). Масло розы, так же как и эфирные масла монарды и кориандра, практически полностью подавляло включение ^{3}[H]-тимидина в кислотонерастворимое клеточное содержимое при концентрации его в культуральной среде, равной 2,5 мг/мл (на 97,4—99,6%). Вместе с тем при уменьшении содержания масла розы в среде инкубации до 250 мкг/мл наблюдалось снижение ингибиции включения предшественника до 36—41,9%. Масло розы в конечной концентрации 25 мкг/мл совершенно не влияло на ФГА-индуцированную бласттрансформацию лимфоцитов человека (рис. 4).

Таким образом, эфирные масла монарды, кориандра и розы способны подавлять индуцированную митогеном реакцию бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека. Эффект подавления включения тимидина в кислотонерастворимое клеточное содержимое прямо зависел от дозы. Причем ингибиция включения тимидина уменьшалась в различной степени — от нескольких процентов при более чем 100-кратном снижении содержания эфирного масла монарды и розы в культуральной среде до полного исчезновения эффекта.

Эффект подавления реакции бласттрансформации лимфоцитов эфирными маслами не был связан со снижением жизнеспособности клеток, поскольку в специальных опытах было показано, что эфирное масло монарды не только не уменьшает жизнеспособности лимфоцитов при длительном культивировании, а даже и несколько увеличивает ее. Срок наблюдения при этом (до месяца) значительно превышал время инкубации культур при ФГА-индуцированной реакции бласттрансформации (3 сут). Возможно, что в основе механизма подавления пролиферативной реакции лимфоцитов лежит ранее показанная способность эфирных масел (в частности масел монарды, кориандра и розы) значительно снижать проницаемость цитоплазматиче-

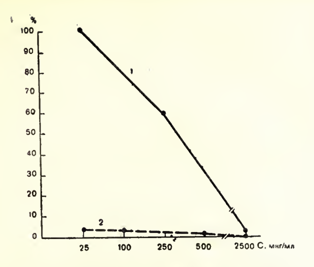


Рис. 4. Включение ^{3}[H]-тимидина в культуру ФГА-стимулированных человеческих лимфоцитов, инкубированных с эфирными маслами розы (1) и монарды (2):

По оси абсцисс — конечная концентрация эфирных масел в культурах, по оси ординат — включение метки по сравнению с контролем.

ских мембран, создавая тем самым дефицит предшественников ДНК и РНК. В пользу этого предположения свидетельствует прямая связь между активностью этих масел в подавлении проницаемости мембран и в ингибиции стимулированной пролиферации лимфоцитов. Кроме того, известно, что в механизме стимулирующего действия митогенов на клетку большую роль играет возрастание селективного транспорта через мембрану, а действие ряда медикаментов, подавляющих ФГА-индуцированную трансформацию лимфоцитов, например, хлорохина, опосредуется стабилизацией мембран [Линг Р., 1971].

Действие на фагоцитарную активность макрофагов

Фагоцитарная реакция играет огромную роль в системе защиты организма от чужеродных веществ и инфекционных агентов. Так, первичным механизмом защиты легких от непрерывно поступающей с воздухом микрофлоры является фагоцитоз альвеолярными макрофагами [Green G. M. et al., 1977; Pryjma J. R., 1982]. Нарушение фа-

гоцитарной активности альвеолярных макрофагов в эксперименте приводит к значительному удлинению сроков вегетирования микрофлоры в дыхательных путях при экспериментальном ингаляционном заражении [Gross G. N., 1978].

Однако известно, что функции макрофагов гораздо шире, чем простое поглощение и переваривание микроорганизмов. Макрофаги активно участвуют в формировании иммунного ответа [Weiss A., 1978; Becker L. G., 1979; Yoshica Y. et al., 1979], концентрируя антигенный материал на своей поверхности и «представляя» его Т- и В-лимфоцитам. Кроме того, через посредство макрофагов передается специфический регулирующий сигнал от Т- к В-лимфоцитам, приводящий к «включению» последних. И, наконец, макрофаги секретируют ряд специфических медиаторов иммунного ответа, осуществляющих регуляторную роль [Петров Р. В., 1982]. Таким образом, действуя на макрофаги, можно влиять на различные стороны защитных реакций организма по отношению к микрофлоре — от первичных защитных барьеров до сложной специфической иммунной реакции на антигены микроорганизмов.

Способность влиять на фагоцитарную реакцию постоянно обращала на себя внимание и исследователей биологически активных растительных препаратов. Так, Б. Е. Айзенман (1975) показал, что экстракты некоторых растений, оказывающие антимикробное действие, способны стимулировать фагоцитарную активность лейкоцитов. Экстракты из листьев грецкого ореха при внутрибрюшинном введении одновременно с культурой стафилококка (белые мыши) подавляли фагоцитоз перитонеальных лейкоцитов, тогда как экстракты из плодов ореха в тех же условиях стимулировали фагоцитоз [Кушнирова О. П. и др., 1985]. По данным М. А. Комаровой (1975), препарат, полученный из пихтовой хвои, который продолжительно в небольших концентрациях вводили мышам ингаляционным путем в виде аэрозоля, значительно стимулировал фагоцитарную активность нейтрофилов, причем стимулировалось не только поглощение микроорганизмов, но и весьма значительно их переваривающая способность. А. К. Неграш (1975), исследуя в этом плане некоторые антибиотические препараты из высших растений, установил, что аренарин (препарат из бессмертника песчанного) и рафин (препарат из редьки) повышали фагоцитарную активность лейкоцитов крови кролика в 1,6—1,8 раза, а при внутрибрюшинном введении белым мышам — в 2—2,5 ра-

за стимулировали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов. Вместе с тем такие препараты, как сальвин (антибиотик из шалфея лекарственного), препарат К (из растения сем. Сложноцветных) и антибиотик псорален практически не влияли in vitro на фагоцитарную активность лейкоцитов.

Вообще скриннинговое исследование влияния каких-либо БАВ на фагоцитарную активность культуры макрофагов представляется весьма заманчивым. Так, прежде всего результаты таких опытов дают представление о том, действует ли вообще данное вещество на соматические клетки, представленные в данном случае макрофагами; во-вторых, можно составить представление о том, каким образом данное вещество действует на фагоцитарную реакцию; в-третьих, результаты этих опытов указывают на вероятность наличия у исследуемого вещества иммуномодулирующих свойств. И наконец, такие данные позволяют судить о сравнительной активности исследуемых веществ по диапазону их действующих концентраций.

Мы оценивали фагоцитарную активность нестимулированных перитонеальных макрофагов мышей по отношению к меченной изотопом культуре патогенного стафилококка.

Использовали перитонеальные нестимулированные макрофаги мышей линии BALB/c. Брюшную полость промывали раствором гепарина, смыв от нескольких животных объединяли, собирали в пластиковый стакан, помещенный в ледяную баню. Подсчитывали число клеток и добавляли бессывороточную среду Игла с таким расчетом, чтобы концентрация перитонеальных макрофагов составляла $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Взвесь клеток разливали по 1 мл в стеклянные пробирки с плоским дном. Пробирки помещали в термостат на $1^1/_2$ ч для прикрепления макрофагов к стеклу, после чего отмывали споласкиванием от неприлипших клеток.

Для приготовления микробной тест-системы культуры St. aureus выращивали в течение суток на бульоне BHI с добавлением ^{3}[H]-тимидина до 1 мкКи на 1 мл. После этого пробку смачивали раствором формалина и инкубировали еще в течение 18 ч при 37 °C. Предварительно было установлено, что с помощью такой процедуры полностью стерилизуется культура стафилококка без заметного влияния на антигенный комплекс микробной клетки. Затем культуры 3 раза отмывали на центрифуге при 3000 об/мин по 10 мин и микробный осадок ресуспендировали в двойном объеме среды Игла.

В пробирки с культурами макрофагов добавляли по 1 мл микробной взвеси и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, после чего содержимое пробирок сливали, монослой несколько раз споласкивали изотоническим раствором хлорида натрия для удаления нефагоцитированных микробных клеток.

Для количественной оценки фагоцитарной реакции в пробирки с монослоем фагоцитировавших макрофагов добавляли по 0,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты и проводили гидролиз в течение 20 мин при 85 °C для фрагментирования микробной ДНК и перевода

ее в растворимое состояние. Затем пробы центрифугировали и измеряли уровень радиоактивности в надосадке с помощью нафталин-диоксанового сцинтиллятора на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Эмульсии эфирных масел готовили путем озвучивания смеси масла с дистиллированной водой на ультразвуковом дезинтеграторе в течение 4—5 мин при амплитуде 18—20 мкм.

Для оценки влияния эфирного масла на фагоцитоз водно-масляную эмульсию в количестве 0,1 мл добавляли в культуру макрофагов после их прикрепления к стеклу и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Затем питательную среду сливали, монослой отмывали несколько раз и добавляли к каждой культуре по 1 мл среды Игла, после чего к макрофагам добавляли микробную взвесь и проводили собственно фагоцитарную реакцию.

Каждую концентрацию эфирного масла исследовали не менее чем на двух параллельных культурах макрофагов.

Для оценки действия некоторых эфирных масел на макрофаги в условиях целостного организма в пробирках (см. выше) исследовали перитонеальные макрофаги мышей, которым в течение 3 дней перед забором клеток вводили внутрибрюшинно по 0,3 мл 0,5% водной эмульсии соответствующего масла. Макрофаги каждой мыши исследовали отдельно в двух параллельных культурах каждые.

Действие эфирных масел на фагоцитарную активность выражали специальным индексом, получаемым от деления средней радиоактивности культур, подвергнутых действию масла, на среднюю радиоактивность контрольных культур.

Были изучены масла монарды, базилика, розмарина, полыни, лимонной, ажгона, лаванды, эльшольции, тысячелистника, кориандра, гладыша, герани, тяжелое хвойное масло и одна из основных фракций эфирного масла лаванды линалилацетата.

Степень фагоцитоза в контрольных культурах значительно разнилась от опыта к опыту. Так, в 3 опытах исходный уровень составлял соответственно 117±24, 196±6 и 267±27 имп/мин, он расценивался нами как исходно низкий. В 2 других опытах радиоактивность контрольных культур была значительно выше — соответственно 506±26 и 621±17. Исходный уровень фагоцитарной активности в этих опытах считался высоким.

Большинство исследованных эфирных масел в той или иной степени изменяли фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов. Однако действующие концентрации масел значительно различались. Так, эфирные масла монарды, базилика и лаванды влияли на фагоцитоз (стимулировали или подавляли) в минимальных использованных концентрациях — 0,5 мкг/мл (конечная концентрация масла в культуре). Эфирное масло герани подавляло фагоцитарную активность (при предынкубации в течение 30 мин с последующей отмывкой) в конечных концентрациях до 5 мкг/мл. Такие масла как масло розмарина, полыни лимонной, ажгона изменяли степень фагоцитоза в концентрации не менее 50 мкг/мл, а эльшольции, тысячелистника и

линалилацетат в концентрации до 500 мкг/мл. И, наконец, тяжелое хвойное масло, масло кориандра и гладыша в использованных концентрациях не влияли на фагоцитарную активность монослоя макрофагов.

При инкубации в течение 30 мин монослоя с такими эфирными маслами, как масло монарды, базилика, ажгона и лаванды фагоцитарная активность стимулировалась при исходном сниженном ее уровне и подавлялась при высоком уровне фагоцитоза в контроле. Так, отношение радиоактивности культуры макрофагов, обработанных маслом, к радиоактивности контрольной культуры составило при низком исходном уровне фагоцитоза: для монарды 1,22, базилика 1,31, ажгона 1,23. При высокой исходной фагоцитарной активности инкубация макрофагов приводила к ингибиции фагоцитоза с маслом монарды с индексом 0,82, базилика — 0,75, ажгона — 0,57, лаванды — 0,52. Полынь лимонная изучалась только в опытах с исходно низкой фагоцитарной активностью и, по-видимому, из-за этого у данного эфирного масла была обнаружена только стимулирующая активность (радиоактивность в культуре с добавлением масла в 1,66 раза выше, чем в контрольных культурах, не обработанных маслом полыни). Масла эльшольции, тысячелистника, кориандра, герани и линалилацетат были использованы только для обработки макрофагов с высокой фагоцитарной активностью в контроле. Предынкубация культур макрофагов с этими маслами сопровождалась слабовыраженной ингибицией поглощения микроорганизмов тест-культурой (радиоактивность в опыте 0,87—0,92 от контроля).

Изучение наиболее активных масел — масла монарды и базилика, в опытах in vivo показало, что оба эти масла при предварительном 3-разовом введении в брюшную полость мышей «подготавливали» перитонеальные макрофаги таким образом, что в последующих опытах in vitro их фагоцитарная активность была значительно выше, чем таковая перитонеальных макрофагов интактных мышей (табл. 5): масло монарды стимулировало фагоцитоз в 2,47 раза, базилика — в 2,86 раза.

Таким образом, в проведенных нами экспериментах выявлена способность некоторых эфирных масел нормализовывать фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей, т. е. повышать сниженный уровень фагоцитоза и уменьшать повышенный. Выявлено разнонаправленное действие различных концентраций ряда эфирных масел. Так, масло монарды в конечной концентрации

Таблица 5. **Фагоцитарная активность макрофагов, полученных от мышей, которым внутрибрюшинно вводили эфирные масла монарды и базилика**

Воздействие	№ опыта	Фагоцитарная активность, имп/мин	Индекс стимуляции
Интактные мыши (контроль)		117±24	—
Введение масла монарды	1	333±51	2,83
	2	492±5	4,2
	3	131±2,5	1,11
	4	208±93,5	1,77
Введение масла базилика	1	360±25	3,07
	2	201±19	1,71
	3	211±101	1,8
	4	569±63	4,68

500 нг/мл обладало стимулирующим влиянием, а в концентрации выше 5 мкг/мл — только ингибирующим. Масло базилика в минимальной изученной концентрации (500 нг/мл) только стимулировало, но не ингибировало фагоцитоз. Эфирное масло лаванды в конечной концентрации 0,5—5 мкг/мл снижало фагоцитарную активность, но не повышало низкую активность, тогда как ажгон в концентрации 50 мкг/мл увеличивал низкую активность и снижал высокий уровень фагоцитоза. Эти результаты дают основание надеяться, что на основе эфирных масел могут быть разработаны новые способы воздействия на иммунный ответ и фагоцитарную активность в зависимости от необходимого эффекта — стимуляции защитной фагоцитарной реакции или коррекции иммунного ответа (стимуляции или ингибиции).

Полученные нами данные в значительной степени совпадают с результатами А. К. Неграша (1975), изучавшего влияние антибиотиков растительного происхождения на фагоцитарную активность лейкоцитов. Он выявил стимулирующее действие некоторых таких антибиотиков на фагоцитоз примерно в таком же диапазоне концентраций — 5—50 мкг/мл. В наших опытах эфирные масла активно влияли на фагоцитоз в концентрации 0,5—50 мкг/мл. Равным образом эфирные масла, показавшие наиболее высокую активность in vitro, могли значительно стимулировать фагоцитоз при внутрибрюшинном введении этих масел мышам.

Вместе с тем наблюдается некоторая разнонаправленность действия масел, поскольку стимулирующие фагоцитоз дозы эфирных масел при внутрибрюшинном введении составляли 75 мг/кг, что может примерно соответствовать концентрации 75 мкг/мл in vitro. Однако подобные дозы в этих опытах вызывали однозначное подавление фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов. Можно предположить несколько возможных причин этого несоответствия. Во-первых, фармакодинамика эфирных масел в организме может быть такова, что истинная концентрация их в брюшной полости значительно меньше расчетной и приближается к стимулирующей in vitro концентрации. Во-вторых, направленность действия эфирного масла в организме может быть изменена вследствие неравномерного связывания отдельных компонентов. В-третьих, введение эфирных масел в брюшную полость может сопровождаться рекрутированием моноцитов с более высокой фагоцитарной активностью.

Эфирные масла в проведенных нами опытах стимулировали фагоцитоз перитонеальных макрофагов мышей в 2,47—2,86 раза, а растительные антибиотики, изученные А. К. Неграшом,— в 2—2,5 раза.

Использованная нами модель оценки влияния эфирных масел на живые клетки по их функциональной активности может быть применена для скриннингового отбора новых эфирных масел или иных БАВ растительного происхождения. При этом способность исследуемого вещества в минимальных концентрациях влиять на фагоцитарную активность макрофагов в пробирочных опытах будет указывать не только на определенные иммуномодулирующие потенции, но и просто на высокую биологическую активность этого вещества.

Действие на пролиферативную активность фибробластов

Одной из важнейших проблем современной медицинской биологии является разработка способов и средств стимуляции восстановительных реакций, восполнение тканевых повреждений, возникающих в результате оперативных вмешательств, патологических процессов, травм и др. В этом направлении проводится активный поиск новых лекарственных средств.

По мнению Г. Л. Билича и В. Э. Коллы (1982), «...лекарственные средства — стимуляторы регенерации — должны... оказывать положительное влияние на синтез ну-

клеиновых кислот...». Известные отечественные средства, стимулирующие регенерацию и принадлежащие к классу синтетических пиримидинов, способны вызывать увеличение концентрации нуклеиновых кислот в клетках однослойной культуры Нер-2 [Русаков В. И., Кучкин В. Т., 1975], а также стимулировать деление у дрожжей [Лифшиц Р. И., Камилов Ф. Х., 1969].

Поэтому представляло определенный интерес оценить способность наиболее активных в антибактериальном отношении эфирных масел монарды и базилика влиять на синтез нуклеиновых кислот в тканевых клетках (фибробластах) в культуре тканей. Как уже было показано выше, данные эфирные масла способны активно влиять на состояние мембран и, соответственно, на активность нуклеинового синтеза в иммунокомпетентных клетках.

Использовали культуру фибробластов легкого плода человека, которую засевали в низкой дозе ($1{,}5 \cdot 10^3$ клеток) в 2 мл среды 199, содержащей сыворотку крупного рогатого скота и антибиотики. Культуры инкубировали при 37 °С в течение 72 ч. Активность синтеза ДНК оценивали по включению ^{3}[H]-тимидина, который добавляли по 2 мкКи/мл за 18 ч до окончания культивирования. После этого монослой фибробластов подвергали кислотному гидролизу и оценивали интенсивность включения метки с помощью нафталин-диоксанового сцинтиллятора на жидкостном сцинтилляционном спектрометре. Радиоактивность культур выражали числом импульсов в минуту.

Эфирные масла добавляли в культуры фибробластов в начале культивирования в виде водно-масляной эмульсии, приготовленной с помощью ультразвукового дезинтегратора. Исходную 0,5% эмульсию разводили средой 199 до необходимой концентрации непосредственно перед внесением в культуры. Действие данного масла на синтез ДНК выражали в виде индекса, представляющего собой частное от деления радиоактивности контрольных культур на радиоактивность культур фибробластов, подвергавшихся действию эфирных масел. Все исследования проводили не менее чем на 2 параллельных культурах.

Оказалось, что добавление эфирных масел монарды и базилика в культуру фибробластов плода легкого человека сопровождалось заметным увеличением синтеза ДНК — возрастало включение ^{3}[H]-тимидина в клетки. Наиболее оптимальными в этом отношении концентрациями были 2,5 мкг/мл для масла базилика (стимуляция включения радиоактивной метки в 7,38 раза) и 250 нг/мл — 2,5 мкг/мл для масла монарды (стимуляция включения в 4,94—5,13 раза). Концентрации масел, равные 250 мкг/мл, практически не влияли на включение изотопа в культуру фибробластов.

Данные радиоизотопного исследования были подтверждены и при микроскопии культур фибробластов: масло ба-

зилика в концентрации 250 мкг/мл заметно не влияло на количество клеток и их морфологию, в то время как масло монарды в этой же концентрации приводило к гибели некоторых клеток. Меньшие же концентрации обоих масел способствовали (по визуальной оценке) значительному увеличению количества клеток.

Таким образом, эфирные масла монарды и базилика проявляли способность значительно стимулировать синтез ДНК и пролиферацию в культуре фибробластов, во всяком случае в культуре фибробластов, полученных из легкого плода человека и при использовании низкой посевной дозы клеток.

Следует отметить, что эффективные концентрации изученных масел в отношении стимуляции синтеза нуклеиновых кислот практически совпадают с эффективными концентрациями in vitro (1—50 мкг/мл) известных средств стимуляции регенерации — синтетических пиримидинов, которые вызывают увеличение содержания нуклеиновых кислот в перевиваемых линиях клеток [Русаков В. Н., 1975].

Среди БАВ растительного происхождения уже известны препараты, проявляющие подобные свойства. Это антимикробные препараты из лекарственных растений — новоиманин, сальвин, аренарин, аманин, оказывающие ранозаживляющее действие [Фалк И. И., 1975; Айзенман Б. Е., 1979; Волосова В. С., 1979], экстракты зверобоя и тысячелистника, эвкалиптовое эфирное масло [Сафарли-Бабаева П. Л., 1979], ускоряющие эпителизацию поврежденной ожогом конъюнктивы [Прокопчук А. Ф., 1979], экстракты календулы и ромашки аптечной [Прокопчук А. Ф., 1975], фитонциды черемши, также ускоряющие заживление ран [Псахис Б. И., 1975], азулен [Адигезалова-Полчаева К. А. и др., 1985].

Интересно, что препараты из чеснока, являющиеся довольно активными стимуляторами регенерации [Волосова П. С., 1979; Спивак И. Я., 1979], в культуре клеток значительно увеличивают число митозов [Орлова Э. А., 1975].

Следовательно, существует определенная вероятность того, что у эфирных масел монарды и базилика могут проявиться свойства стимулировать регенерацию поврежденных тканей или органов в опытах на живых организмах.

Таким образом, установлено, что эфирные масла активно влияют на культуры соматических клеток: на проницаемость мембран, функциональную активность иммунокомпетентных клеток, пролиферативные реакции. Выраженность этих свойств у различных эфирных масел

значительно отличается. Такие эфирные масла, как масло монарды дудчатой и базилика эвгенольного, обладающие наибольшей бактерицидностью, наиболее активны и в отношении соматических клеток в культуре. Эти масла оказывают заметное регистрируемое влияние на клетки в минимальных изученных концентрациях — 250—500 нг/мл. Другие изученные эфирные масла также характеризуются определенными минимально действующими концентрациями в отношении культур соматических клеток. По величине этих концентраций масла могут быть разделены на определенные группы, т. е. в какой-то степени классифицированы по активности в отношении клеточных культур.

Следует отметить, что различные диапазоны концентраций функционально различаются в пробирочных опытах для одного и того же масла. Так, эфирное масло монарды в высоких концентрациях (более 50 мкг/мл) обладает преимущественно ингибирующим действием на состояние клеток и их функциональную активность (снижение проницаемости мембран, пролиферативной реакции лимфоцитов на ФГА, угнетение высокой фагоцитарной активности макрофагов). Концентрации ниже 25 мкг/мл оказывают уже преимущественно стимулирующее действие. Особенно эффективны в этом отношении низкие концентрации масла монарды (250—500 нг/мл), обладавшие наиболее высокой стимулирующей активностью в испытанных культурах. Практически то же самое можно сказать и об эфирном масле базилика эвгенольного: преимущественно ингибирующее действие высоких концентраций и преимущественно стимулирующее — низких.

Относительно причин, лежавших в основе разнонаправленного действия различных концентраций эфирных масел, можно высказать несколько предположений. Прежде всего, следует учитывать, что эфирные масла — это многокомпонентные вещества, различные составляющие которых оказывают сложное, по-видимому, взаимовлияющее и взаимообусловленное действие на клетку. Естественно, что компоненты в эфирных маслах находятся в далеко не равном количественном соотношении. Поэтому при уменьшении концентрации, при разведении масла, некоторые его компоненты вообще остаются в следовых количествах и фактически «выключаются» из общего, суммарного, действия. Из этого следует, что изменение концентрации эфирных масел, очевидно, равнозначно превращению их практически в иные вещества, обладающие уже и несколько иной биологической активностью. Именно это мы и на-

блюдали при исследовании действия эфирных масел на культуры соматических клеток — разнонаправленное действие различных концентраций этих масел.

Однако эта точка зрения встречает серьезные возражения. Необходимо вспомнить, что в проведенных нами исследованиях мы использовали водно-масляные эмульсии эфирных масел, приготовленные с помощью ультразвукового дезинтегратора и в последующем разводившиеся до необходимых концентраций. Хотя такие эмульсии характеризуются значительной дисперсностью и устойчивостью, тем не менее в микрокаплях, составляющих эмульсию, эфирное масло находится, по-видимому, практически в цельном, неразведенном состоянии. При дальнейшем разведении исходной эмульсии уменьшается только число микрокапель, но не концентрация составляющего их эфирного масла. Таким образом, изменяется только, вероятно, абсолютное количество поступившего в клетку (или воздействовавшего на ее мембрану) эфирного масла.

Вместе с тем следует отметить, что при озвучивании эфирного масла какое-то количество его растворяется в воде и, таким образом, на клетку действуют как истинный раствор (также не соответствующий исходному маслу из-за различной водорастворимости компонентов), так и микрокапли эмульсии. В условиях целостного организма все это усложняется, по-видимому, еще и тем, что накладываются дополнительные факторы — возможность растворения какого-то количества масла или его компонентов в липидах, неодинаковая скорость выведения различных компонентов и др.

Таким образом, можно заключить, что переносить свойства масел, выявленных в опытах in vitro, в условия целостного организма вряд ли представляется возможным. Такого рода эксперименты позволяют только выявить наиболее активные масла (также с известной долей вероятности) и примерно определить направленность их действия.

Часть II

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА ОРГАНЫ И СИСТЕМЫ ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА

Глава 4

ДЕЙСТВИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ

В настоящее время весьма актуальной является проблема возникновения, развития и особенно коррекции так называемых вторичных иммунодефицитов, или вторичной иммунологической недостаточности. Необходимость эффективной коррекции таких состояний диктуется их весьма широким распространением, возникновением в результате целого ряда самых различных воздействий — химических, медикаментозных и других, вследствие влияния патологических процессов, особенно хронических воспалительных. В этих случаях патологический процесс и иммунодефицит оказывают в значительной степени взаимосвязанное действие, поскольку возникающая разрегуляция функций отдельных звеньев иммунной системы приводит к ослаблению иммунного ответа на микробы или иные антигены и, соответственно, к невозможности их эффективной элиминации, что, естественно, является фактором, способствующим продолжению патологического процесса. Большое значение проблема вторичных иммунодефицитов имеет при бронхолегочной патологии, например при хронических неспецифических заболеваниях легких, когда обычно выявляются различной степени вторичные иммунодефициты, в частности Т-иммунодефициты, требующие соответствующей иммунокоррекции для достаточно эффективного лечения [Походзей И. В. и др., 1983; Петров Р. В., 1984].

Таким образом, эффективное лечение ряда патологических процессов требует, по-видимому, непременного применения иммуномодулирующих препаратов, причем желательно направленного действия в отношении различных звеньев иммунной системы, например Т-системы, определенных иммунорегуляторных субпопуляций лимфоидных клеток, гуморального или клеточного звена иммунного ответа и др., поскольку вторичные иммунодефициты могут быть опосредованы самыми различными механизмами. Вместе с тем число иммуномодулирующих препаратов в

настоящее время невелико [Земсков М. В., 1984]. В основном это вещества, вырабатываемые вилочковой железой, гормоны, витамины, некоторые микробные препараты, различные синтетические химические вещества (пиримидиновые производные, левамизол и др.). Многие из имеющихся в настоящее время иммуномодуляторов обладают побочным действием различной степени выраженности. Все это требует поиска новых иммуномодулирующих веществ, расширения круга иммуномодулирующих препаратов. Кроме того, следует отметить, что иногда иммуномодулирующее воздействие должно быть не очень резко выражено. Так, в начальных стадиях ряда бронхолегочных заболеваний необходимо применять так называемые мягкие иммуномодуляторы, обладающие нерезко выраженным действием [Марциновский В. Ю., Сильвестров В. П., Караулов А. В., 1983].

Большим источником возможных иммуномодуляторов могут быть продукты природного происхождения. Например, в настоящее время испытываются различные бактериальные экстракты, полисахариды из дрожжей, грибов, бактериальные пептидогликаны, дрожжевая РНК, полисахариды из лишайников и др. [Никитин А. В., 1983]. Вместе с тем известны факты, прямо или косвенно указывающие на возможность разработки новых эффективных иммуномодулирующих препаратов на основе бактерицидных растительных субстанций — фитонцидов [Бондаренко А. С., 1981; Говорун М. И., 1985]. Имеются указания на способность некоторых антимикробных веществ растительного происхождения стимулировать антителообразование [Айзенман Б. Е., 1975]. А. К. Неграш (1981) и П. С. Волосовец (1981) установили, что такие растительные антибиотики как аренарин, новоиманин и сальвин оказывают профилактическое действие при различных экспериментальных инфекциях. Авторы расценивали это как свидетельство в пользу стимуляции этими веществами защитных сил организма.

А. С. Бондаренко (1979) при исследовании действия 115 антимикробных веществ растительного происхождения на антителообразование мышей в ответ на эритроциты барана выявил 7 образцов, повышающих уровень антител в 2—4 раза, и 28 образцов, ингибирующих антителопродукцию в 2—8 раз. Растительный антибактериальный препарат новоиманин (выделенный из зверобоя продырявленного) при введении одновременно с антигеном значительно повышал уровень антител (в 2—8 раз), т. е. оказывал

заметное адъювантное действие [Волосовец П. С., 1979]. Использование ряда фитонцидных препаратов в клинических условиях при легочной патологии позволило В. Н. Молоткову (1981) сделать заключение о их благотворном воздействии на состояние защитных сил организма.

Косвенным свидетельством возможного наличия иммуномодулирующей активности у эфирных масел может служить тот факт, что многие из них являются довольно сильными антиоксидантами. Известно, что введение экспериментальным животным природных (витамин Е) или синтетических антиоксидантов (ионол, сантохин) сопровождается стимуляцией гуморального или клеточного иммунитета. Антиоксиданты, относящиеся к β-оксипроизводным азотистых гетероциклов, проявляют выраженную иммунодепрессивную активность [Суздальцева А. А. и др., 1982].

Существенно, что фитонциды могут оказывать определенное влияние на иммунную систему и в виде летучих фракций или аэрозолей, т. е. в состоянии, наиболее близком к природному [Макарчук Н. М., 1979, 1981, 1985; Талдыкин О. Е., 1981; Незговоров Г. И. и др., 1985; Шаповал В. В., 1985].

Описанные выше свойства эфирных масел — активное влияние на состояние иммунокомпетентных клеток в культуре (подавление митогениндуцированной пролиферативной реакции лимфоцитов, изменение проницаемости цитоплазматических мембран, модифицирование различным образом фагоцитарной активности макрофагов) — свидетельствуют о возможности воздействия наиболее активными in vitro маслами на иммунные реакции в условиях целостного организма.

Действие на первичный гуморальный иммунный ответ

Мы оценивали действие эфирных масел монарды дудчатой и базилика эвгенольного на первичный иммунный ответ мышей на тимусзависимый антиген — эритроциты барана.

Использовали мышей линий BALB/c и CBA с массой тела 18—20 г. Иммунизацию проводили либо внутривенным (в хвостовую вену), либо внутрибрюшинным введением взвеси эритроцитов барана в количестве $1 \cdot 10^8$—$1 \cdot 10^9$ в изотоническом растворе хлорида натрия. На 5-й день после иммунизации оценивали активность первичного иммунного ответа по числу антителообразующих клеток (АОК) в гомогенате селезенки и по титру антител в сыворотке крови. Чис-

ло АОК определяли методом локального гемолиза в агаровом геле по Ерне и результаты соотносили с $1 \cdot 10^6$ ядросодержащих клеток селезенки. Уровень антител определяли в реакции гемагглютинации в ряде последовательных двукратных разведений декомплементированной сыворотки крови каждого животного начиная с разведения 1 : 20.

Эфирные масла монарды дудчатой или базилика эвгенольного вводили животным в виде 0,5% озвученной водно-масляной эмульсии в объеме 0,3 мл (т. е. по 70 мг/кг) внутрибрюшинно в различные сроки по отношению к иммунизации: в дни —3, —2, —1 либо в дни 0, +1, +2, или +2, +3. Водную эмульсию эфирных масел готовили на дистиллированной воде ex tempore путем 5-минутного озвучивания на ультразвуковом дезинтеграторе при амплитуде 18—20 мкм.

В данных условиях иммунизация мышей СВА внутривенным введением эритроцитов барана в дозе $1 \cdot 10^8$ или $1 \cdot 10^9$ сопровождалась заметным повышением первичного иммунного ответа, регистрируемого на 5-й день (табл. 6). Внутрибрюшинное введение мышам эфирного масла монарды вызывало в ряде случаев изменение выраженности первичного иммунного ответа. Причем характер изменений в значительной степени зависел от исходного (контрольного) уровня ответа, который в свою очередь определялся дозой антигена и тем, какая линия мышей использовалась — высокореагирующая на эритроциты барана (СВА) или менее высокореагирующая (BALB/c).

Таблица 6. **Первичный иммунный ответ мышей на эритроциты барана под влиянием внутрибрюшинного введения эфирного масла монарды (70 мг/кг)**

Линия мышей	Показатель	Нормальные мыши	Иммунный ответ при введении масла			
			−5, −4, −3 дни	−3, −2, −1 дни	0, +1 дни	−2, −3 дни
СВА	АОК	252±36	—	105±27*	256±75	225±44
	АТ	2,8±0,2	—	2,5±0,5	4,4±0,5*	4,25±0,25*
BALB/c	АОК	79±16	—	105±31	183±47	—
	АТ	1,8±0,41	—	2,4±0,24	3,8±0,5*	—
СВА	АОК	221±42	302±36	—	—	—
	АТ	6,0±0,001	6,2±0,075	—	—	—
СВА	АОК	175±69	—	246±54	139±30	172±42
	АТ	8,8±0,58	—	7,2±0,58	8,4±0,67	7,4±0,39

Примечание. АТ — $\log_2$ титра гемагглютининов.
* Различия с соответствующими параметрами у интактных животных статистически значимы ($P<0,05$).

При достаточно большом контрольном уровне первичного ответа по АОК (более высокая доза, мыши СВА) 3-кратное внутрибрюшинное введение эмульсии масла мо-

нарды до иммунизации, в дни −3, −2 и −1, приводило к значимому уменьшению числа АОК в селезенке. Введение этого же масла в дни 0 и +1, либо в дни +2 и +3 практически не влияло на число АОК, образующихся в ответ на иммунизацию, но вызывало значимое повышение уровня антиэритроцитарных антител в крови в случае их низкого исходного уровня.

При среднем контрольном уровне первичного иммунного ответа внутрибрюшинное введение водной эмульсии масла монарды независимо от временного соотношения с иммунизацией не влияло ни на число АОК, ни на уровень антител в крови.

Вместе с тем у мышей, низкореагирующих на эритроциты барана линии BALB/c, введение эфирного масла монарды, особенно одновременно с иммунизацией (в дни 0 и +1), приводило к значимой стимуляции образования АОК и повышению уровня антиэритроцитарных антител.

Масло базилика эвгенольного при внутрибрюшинном введении также вызывало изменения первичного иммунного ответа на эритроциты барана у мышей (табл. 7). При этом направленность изменений была аналогичной таковой в опытах с маслом монарды и была связана с исходным уровнем (контрольным) иммунного ответа. Так, при достаточно высоком первичном иммунном ответе у мышей

Таблица 7. **Первичный иммунный ответ мышей линии CBA на эритроциты барана под влиянием внутрибрюшинного введения эфирного масла базилика эвгенольного**

Показатель	Доза масла, мг/кг	Иммунный ответ		
		норма	дни введения масла по отношению к иммунизации	
			−3, −2, −1	0, +1, +2
АОК	—	221±42	—	—
	70	—	244±59	112±25 *
АТ	—	6±0,001	—	—
	70	—	5,8±0,37	5,2±0,38 *
АОК	—	92±38	—	—
	140	—	—	98±25
	70	—	—	81±25
	7	—	—	66±23
АТ	—	5,6±0,245	—	—
	140	—	—	6,75±0,21 *
	70	—	—	7,0±0,31 *
	7	—	—	6,25±0,25

* Разница статистически значима по отношению к контролю ($p<0{,}05$).

контрольной группы внутрибрюшинное введение водной эмульсии масла базилика одновременно с иммунизацией и в течение 2 последующих дней (дни 0, +1 и +2) сопровождалось снижением как числа АОК (почти в 2 раза), так и титра антиэритроцитарных антител. Вместе с тем при таком же исходном уровне первичного иммунного ответа масло базилика, введенное до иммунизации в дни −3, − 2 и −1, практически не оказывало сколь-нибудь заметного влияния на первичный иммунный ответ. Однако при исходно низком гуморальном иммунном ответе введение масла базилика одновременно с антигеном и в последующие 2 дня после иммунизации (дни 0, +1 и +2) значимо стимулировало антителопродукцию — более чем в 2 раза по абсолютным цифрам. Количество АОК в селезенке при этом осталось неизменным. Уменьшение дозы масла сопровождалось исчезновением эффекта стимуляции антителообразования.

Таким образом, эфирные масла монарды дудчатой и базилика эвгенольного, проявлявшие наибольшую активность среди всех изученных нами эфирных масел в опытах in vitro с микроорганизмами и живыми клетками, способны оказывать определенное влияние на иммунокомпетентные клетки и в условиях целостного организма. Эти эфирные масла в определенной степени нормализуют уровень первичного иммунного ответа на корпускулярный тимусзависимый антиген (эритроциты барана). Вместе с тем реализация этого нормализующего эффекта в значительной степени зависела от времени введения масел относительно времени иммунизации. Для масла монарды дудчатой характерным была преимущественная стимуляция антителообразования при введении его после иммунизации и при исходно низком уровне антител. Однако это же масло не оказывало никакого влияния на антителопродукцию при исходно высоком уровне антител или при введении масла до иммунизации (даже при низком уровне антител).

Способность эфирного масла монарды стимулировать выработку антител при первичном ответе у мышей линии BALB/c, отвечающих на эритроциты барана не так активно, как мыши линии СВА, можно в определенной степени трактовать как проявление свойства фенотипической иммунокоррекции генетически детерминированного невысокого иммунного ответа [Петров Р. В., Хаитов Р. М., 1981], причем, по-видимому, на уровне клеток-антителопродуцентов. Резюмируя, можно отметить, что масло монарды дудчатой, оказывая различное действие на число

АОК в селезенке, либо стимулировало антителопродукцию в ответ на эритроциты барана в первичном иммунном ответе при их невысоком контрольном уровне, либо не влияло на уровень антител, когда титр их у контрольных животных был достаточно высоким. При этом стимулирующее действие проявлялось только при введении масла одновременно с антигеном или после иммунизации.

Эфирное масло базилика в отличие от масла монарды при внутрибрюшинном введении приводило к снижению первичного иммунного ответа (как по числу АОК, так и по уровню антител) при одновременном с иммунизацией введении и достаточно высоком контрольном числе АОК в селезенке. Вместе с тем это масло несколько стимулировало антителообразование при исходно низком числе АОК.

Действие на вторичный гуморальный иммунный ответ

Приведенные выше данные о влиянии эфирных масел на первичный иммунный ответ важны в плане выяснения возможности действия масел на иммунокомпетентные клетки в условиях целостного организма, для выявления основной направленности этого действия и определения в какой-то возможной мере его механизма [Арзамасцев Е. В., 1985]. Большее практическое значение имеет, по-видимому, изучение влияния эфирных масел на вторичный гуморальный иммунный ответ, поскольку именно этот вид иммунного ответа играет основную роль в защите организма от инфекций.

Мы изучали влияние эфирного масла монарды на иммунный ответ кроликов на растворимый тимусзависимый белковый антиген — бычий сывороточный альбумин (БСА), а также на вакцину, приготовленную из культуры стафилококков, в условиях длительной иммунизации при различной продолжительности и различных схемах введения эфирного масла.

Кроликам обоего пола (масса тела 2—3 кг) БСА вводили по 1 мг в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия внутрикоъюнктивально во внутреннюю поверхность верхнего века обоих глаз поочередно в течение 8 дней (дни 0, +1, +2, +3, +4, +7, +8, +9 и +10) и один раз внутримышечно (день +14) — 10 мг БСА. Забор крови для определения уровня антител, а также кожные пробы проводили спустя неделю после последней инъекции БСА (22-й день от начала иммунизации).

В сыворотке крови определяли титр антител с помощью реакции пассивной гемагглютинации по Бойдену с нагрузкой БСА на формалинизированные, таннизированные эритроциты барана. Реакцию проводили по общепринятой методике в объеме 0,5 мл с использованием

серологических агглютинационных планшетов. Уровень антител против БСА выражали в ступенях 2-кратных разведений, начиная с разведения 1 : 10. При этом учитывали последнее разведение, дающее выраженную агглютинацию.

Результаты внутрикожных проб с 1 мг БСА учитывали спустя 8—12 ч после тест-инъекций. Выраженность реакции оценивали по 5-балльной системе: 5 баллов — наличие некроза в месте введения БСА, а 0 баллов — отсутствие реакции.

Эфирное масло монарды в этих опытах использовали в виде 1% эмульсии на твине-80 и вводили кроликам внутримышечно по 0,5 мл (т. е. по 2 мг/кг) в течение трех последовательных дней; 1-й группе в дни —6, —5 и —4 по отношению к первому дню иммунизации, 2-й группе — в дни 0, +1 и +2 и 3-й группе — в дни +14, +15 и +16. Контрольную группу животных иммунизировали БСА по описанной выше схеме, но без каких-либо дополнительных воздействий.

В другой серии опытов оценивали прямое адъювантное действие эфирного масла монарды при введении его в смеси с антигеном. Для этого кроликов иммунизировали формол-вакциной, приготовленной из суточной культуры золотистого стафилококка. Схема иммунизации включала 5 внутримышечных инъекций, проводимых через день в течение 2 нед, 3 внутрибрюшинные и 3 внутривенные инъекции также через день в течение 2—3 нед. Эфирное масло монарды в виде 0,25% эмульсии на твине-80 вводили непосредственно в смеси с антигеном в равных объемах. Титр противостафилококковых антител определяли также в реакции пассивной гемагглютинации по Бойдену с нагрузкой на формалинизированные, таннизированные эритроциты барана водно-солевого экстракта, полученного из гомогената культуры золотистого стафилококка.

При длительной иммунизации кроликов БСА 9-кратная внутриконъюнктивальная и внутримышечная иммунизации, проводимые в течение 2 нед, сопровождались появлением в крови достаточно высокого уровня агглютинирующих антител, составлявшего в среднем 8 ступеней разведения (или 1 : 1280). Внутрикожная проба с БСА у животных, не подвергнутых действию масла монарды, сопровождалась появлением спустя 8—12 ч после инъекции кожной реакции, оцененной в среднем в 1,44±0,83 балла.

Введение иммунизированным кроликам 1% эмульсии эфирного масла монарды 3-кратно в дни −6, −5 и −4 по отношению к первому дню иммунизации сопровождалось статистически значимым возрастанием титра антител против БСА в ответ на последующую иммунизацию — до 10,83±0,87 ступеней разведения. Средний титр антител. выраженный в абсолютных цифрах, увеличился у кроликов этой группы почти в 18 раз. Не менее чем в 3 раза возросла также выраженность кожной реакции (до 4,3±0,48 балла) на введение БСА.

Введение масла монарды кроликам в первые три дня иммунизации (дни 0, +1 и +2) приводило к повышению выработки антител против БСА в 9,2 раза по средним аб-

солютным величинам титров. Однако при этом выраженность кожных реакций практически не отличалась от контрольных показателей ($1,7 \pm 0,67$ против $1,44 \pm 0,83$ балла). И, наконец, введение эмульсии масла монарды после окончания иммунизации (до оценки ответа — в дни +14, +15 и +16) незначительно увеличивало уровень антител (в 2 раза по абсолютным величинам титров — до 1 : 2560 против 1 : 1280 в контроле). Выраженность кожных реакций у кроликов этой группы не отличалась от таковой в контроле.

Совершенно иные результаты были получены при многократном введении антигена непосредственно в смеси с эмульсией эфирного масла монарды. В этих условиях у животных уровень антител к стафилококковому антигену был значительно снижен по сравнению с контролем.

В середине цикла иммунизации — через 3 нед после ее начала — титр антистафилококковых антител составлял $7,5 \pm 0,28$ ступеней разведения в опытной группе против $12,2 \pm 0,58$ в контроле ($p < 0,01$). При оценке антителообразования после окончания иммунизации разница сохранялась, уровень антител у животных, подвергнутых действию масла монарды, составлял $5,6 \pm 0,35$ против $9 \pm 0,28$ у кроликов контрольной группы (рис. 5).

Таким образом, эфирное масло монарды оказывало выраженное стимулирующее либо угнетающее действие на вторичный иммунный ответ. При 3-кратном внутримышечном введении эмульсии этого масла (причем не в место введения антигена) за 4—6 дней до начала иммунизации наблюдалось 18-кратное увеличение титра вырабатываемых антител со значительно более высоким, чем в контроле, содержанием преципитирующих антител. Также довольно значительная, однако несколько меньшая стимуляция антителообразования (9-кратная) отмечалась при введении эмульсии монарды в первые три дня иммунизации, однако количество преципитинов при этом не отличалось от контроля. Наконец, 3-кратное введение масла после окончания иммунизации практически не влияло на антителопродукцию. Значительная стимуляция иммунного ответа при введении масла за несколько дней до начала иммунизации, возможно, связана со стимуляцией клеток-предшественников или с воздействием на антигенпредставляющие клетки. Несоответствие с результатами, полученными при изучении действия масла монарды на первичный иммунный ответ, когда введение этого масла в сходные сроки по отношению к иммунизации (в дни −5, −4

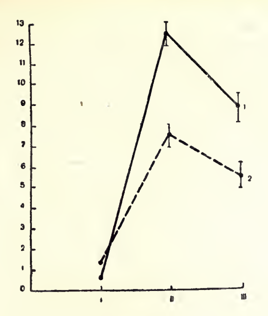


Рис. 5. Вторичный иммунный ответ у кроликов при введении стафилококкового антигена непосредственно в смеси с эфирным маслом монарды (2) и у животных, иммунизированных без масла (1).

По оси абсцисс — сроки оценки иммунного ответа: в начале иммунизации (I), спустя 3 нед (II) и после окончания иммунизации (III); по оси ординат — уровень антител в ступенях двукратных разведений.

и —3) не влияло на уровень ответа, может быть объяснено несколькими причинами. Возможно это связано с различием в характере использованных антигенов (корпускулярного в одном случае и растворимого в другом), с разными видами экспериментальных животных (кролики, мыши). Вероятно, что вторичный иммунный ответ как более Т-зависимый по сравнению с первичным в большей степени подвержен и регулирующему влиянию предварительного введения эфирного масла монарды. Весьма вероятно также, что эти несоответствия обусловлены значительными различиями в дозах введенного масла: при исследовании влияния на первичный иммунный ответ использовалась доза, более чем в 30 раз превышающая дозу эфирного масла монарды, примененную при изучении действия на вторичный иммунный ответ (соответственно 70 и 2 мг/кг).

Сходный эффект был отмечен А. К. Неграш (1981), выявившего у некоторых препаратов антибиотиков из высших растений способность оказывать профилактическое действие по отношению к экзотоксину золотистого стафилококка. Активность этих препаратов падала с повышением их дозы.

Примечательно, что эфирное масло монарды не оказывало прямого адъювантного действия, а напротив, подавляло антительный ответ при неоднократном введении в смеси с антигенами. Механизм этого явления объяснить трудно, возможно в данных условиях опыта имела место значительная активация фагоцитирующих клеток в месте введения антигена, что может сопровождаться подавлением иммунного ответа [Yoshica Y., 1983].

Действие эфирного масла монарды дудчатой на гиперчувствительность замедленного типа

Реакции гиперчувствительности замедленного (ГЗТ) типа имеют немаловажное значение при различного рода патологических процессах. Считается, что состояние ГЗТ отягощает течение инфекционного воспалительного процесса, вызванного условно-патогенной микрофлорой, например стафилококком [Гудкова Е. И., Сахаров П. П., 1977]. Вместе с тем реакции ГЗТ играют основную защитную роль при инфекционных болезнях, вызываемых различными микроорганизмами с внутриклеточным типом паразитирования. В частности установлено, что реакции ГЗТ имеют протективное значение при туберкулезе [АПТ С. С. и др., 1984].

Имеются сведения о способности некоторых препаратов растительного происхождения стимулировать [Мишенкова Е. П., 1985] или угнетать [Приходько В. А., 1985] реакции ГЗТ в экспериментальных условиях. Исходя из этого представляло определенный интерес выяснить, влияет ли эфирное масло монарды дудчатой, проявившее определенную активность в отношении антителообразования, на развитие реакций ГЗТ к различным антигенам — комплексным микробным (стафилококковым), растворимым белковым и трансплантационным.

I модель. Белых беспородных мышей сенсибилизировали дезинтегратом формол-вакцины, приготовленной из суточной культуры патогенного стафилококка. Дезинтеграт в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия вводили подкожно в подушечки задних лап 2 дня подряд по одному разу в день. Эфирное масло монарды вводили в виде 1% озвученной водно-масляной эмульсии по 0,5 мл (т. е.

250 мг/кг) внутрибрюшинно по трем различным схемам: в течение 3 дней, предшествовавших иммунизации (дни —3, —2 и —1), в течение 3 дней одновременно с иммунизацией (дни —1, 0 и +1) и 2 дня подряд после окончания иммунизации (дни +3 и +4). Реакции ГЗТ оценивали на 14-й день после окончания иммунизации, когда мышам внутрикожно в область спины вводили 0,1 мл стафилококкового антигена, использованного для иммунизации. Спустя 24 ч животным вводили внутривенно по 0,5 мл 0,35% раствора красителя синего Эванса. Через 10 мин мышей забивали (цервикальная дислокация) и на внутренней поверхности шкурки измеряли диаметр синего пятна.

II модель — оценка у кроликов ГЗТ, возникающую в ответ на продолжительное введение БСА. Кроликов иммунизировали БСА внутриконъюнктивально по 1 мг в течение 8 дней, а затем однократно вводили 10 мг БСА внутримышечно. На 22-е сутки после первого дня иммунизации в асептических условиях забирали пробу периферической венозной крови из краевой вены уха и исследовали в реакции торможения миграции лейкоцитов с БСА в концентрации 100 мкг/мл. Реакцию проводили в 5-просветных капиллярах Трашанова. Эфирное масло монарды вводили внутримышечно в виде 1% эмульсии на твине-80 по 2 мг/кг в течение 3 дней.

III модель — оценка влияния масла монарды на скорость отторжения кожного аллотрансплантата у мышей. Трансплантат получали от мышей-самцов линии CBA. У забитых животных в области спины выщипывали шерсть, отсепаровывали участок кожи размером 2,5×3 см, очищали от подкожного жира, разрезали на 4—6 прямоугольников и помещали в чашку Петри с изотоническим раствором хлорида натрия. Реципиентами служили самцы линии BALB/c, значительно отличающиеся от мышей линии CBA по антигенам комплекса гистосовместимости. Под внутрибрюшинным гексеналовым наркозом у реципиентов выщипывали шерсть на спине на участке размером примерно 2×2 см. Затем острыми ножницами выкраивали участок кожи прямоугольной формы с закругленными углами, по размерам соответствующий трансплантату. Трансплантат укладывали на рану, тщательно подгоняли края в край с дефектом кожи и приклеивали к краям здоровой кожи. После застывания клея мышей рассаживали по 3—4 особи в клетки. Степень отторжения аллотрансплантата оценивали визуально, оценку проводили один раз в день сотрудники, не участвующие в эксперименте. Отторжением считали полное ссыхание и отпадение трансплантата, когда на нем уже не оставалось «живых» участков. Подопытным мышам вводили внутрибрюшинно по 0,3 мл озвученной 0,5% эмульсии эфирного масла монарды (т. е. по 70 мг/кг). Масло, как и в других опытах, вводили по 3 дня: 1-й группе в течение 3 дней, непосредственно предшествовавших операции, 2-й группе — в день трансплантации и в течение двух последующих дней, 3-й группе — с 4-го по 6-й день после операции.

Двукратная сенсибилизация мышей в подушечки лап дезинтегратом культуры патогенного стафилококка сопровождалась спустя 2 нед развитием выраженной реакции ГЗТ. Средний диаметр синего пятна на внутренней поверхности шкурки у мышей контрольной группы составлял 0,45±0,12 см, введение эфирного масла монарды в дозе 250 мкг/мл 3-кратно до иммунизации, в дни —1, —2 и —3 сопровождалось значительным уменьшением выраженно-

сти кожной реакции у мышей, сенсибилизированных аналогично контрольной группе. При этом диаметр пятна составлял в среднем 0,156±0,08 см ($p<0,05$). Одновременное с иммунизацией введение эфирного масла монарды (в дни −1, 0 и +1) также сопровождалось значительным снижением кожной реакции ГЗТ (0,146±0,035 см).

Наиболее эффективно реакцию ГЗТ ингибировало внутрибрюшинное введение эмульсии масла монарды в дозе 250 мг/кг на 3-й и 4-й дни после иммунизации. У всех мышей этой группы выраженность реакции ГЗТ по диаметру синего пятна не превышала 0,1 см.

При длительной интраконъюнктивальной иммунизации кроликов растворимым белковым антигеном (БСА) внутримышечное введение эмульсии эфирного масла монарды по 2 мг/кг в течение 3 дней до начала иммунизации (дни −6, −5 и −4) сопровождалось уменьшением выраженности реакции ГЗТ. Средняя степень задержки миграции лейкоцитов в группе составила 34,5±3,6%. У кроликов контрольной группы, которым масло монарды не вводили, реакция ГЗТ в ответ на длительную иммунизацию характеризовалась снижением миграции лейкоцитов периферической крови на 59,7±9% ($p<0,05$ по U-критерию Вилкоксона—Манна—Уитни). Воздействие на животных эфирным маслом в течение 3 дней, начиная с 1-го дня иммунизации (в дни 0, +1 и +2), а также после окончания иммунизации (в дни +14, +15 и +16) не приводило к подавлению формирования ГЗТ. Задержка миграции лейкоцитов в этих группах составляла соответственно 40,4±16 и 46±15% (разница с контролем статистически незначима).

И, наконец, в III модели экспериментов эфирное масло монарды также оказывало сходное действие. Аллотрансплантация кожного лоскута мышей линии CBA мышам BALB/c сопровождалась переживанием трансплантата в среднем в течение 8,74±0,74 сут в случае, когда реципиенты не подвергались никакому воздействию. Однако введение водной эмульсии масла в ежедневной дозе 70 мг/кг в течение 3 дней сопровождалось некоторым увеличением времени переживания трансплантата (до 12,0±0,35 суток). Этот эффект проявился главным образом при введении эфирного масла в день трансплантации и в два последующих дня. Отмечалась тенденция к удлинению срока отторжения кожного лоскута и при остальных схемах введения масла монарды, однако этот эффект не был стабилен (длительность выживания кожного лоскута — 10—11 дней). Вместе с тем замедление реакции отторже-

ния при внутрибрюшинном введении эмульсии масла отмечалось в двух независимых экспериментах.

Таким образом, эфирное масло монарды может подавлять развитие реакции ГЗТ по отношению к самым различным антигенам, при использовании различных схем сенсибилизации и в довольно широком диапазоне доз — от 2 до 250 мг/кг. Введение высоких доз сопровождалось отчетливым подавлением формирования реакции ГЗТ по отношению к стафилококковому антигену при любых схемах. Средние дозы (70 мг/кг) подавляли отторжение кожного аллотрансплантата, однако только при одновременном с трансплантацией введении. Вместе с тем довольно низкие дозы (2 мг/кг) также ингибировали развитие реакции ГЗТ, однако уже только при предварительном (за 3 дня до начала иммунизации) введении. Следует отметить, что эффект ингибиции ГЗТ наблюдался в опытах на двух различных видах животных.

Данная постановка опытов не позволяет сделать какого-либо определенного заключения о механизме подавления формирования ГЗТ эфирным маслом монарды. Во всяком случае высокие дозы этого масла (250 мг/кг) подавляли ГЗТ на всех этапах формирования реакции распознавания антигена, взаимодействия клеток и накопления эффекторов. Малые дозы (2 мг/кг) были эффективны только при их действии на иммунокомпетентные клетки, еще не контактировавшие с антигеном. Дозы масла в 70 мг/кг подавляли реакции ГЗТ преимущественно на этапах распознавания антигена и клеточной кооперации. Однако следует отметить, что речь идет все-таки о воздействии главным образом на этап формирования реакции ГЗТ, но не на эффекторную ее фазу, поскольку промежуток времени между введением масла и оценкой реакции был, как правило, достаточно велик (от 10 до 26 сут).

Действие эфирных масел, вводимых в дыхательные пути, на иммунную систему

Введение фитонцидов в организм через дыхательные пути — это наиболее традиционный путь лечебного их применения, который диктуется самой природой фитонцидов как преимущественно летучих БАВ. В значительной степени традиционным является и местное применение различного рода фитонцидов при заболевании дыхательных путей и легких. Можно с известной долей уверенности предположить, что даже при приеме внутрь многих фитон-

цидных средств, особенно препаратов лука или чеснока, они действуют на легкие преимущественно при выделении из организма с выдыхаемым воздухом.

Необходимо отметить также тот факт, что летучие фитонциды используются, как правило, в небольших концентрациях, однако и при этом оказывают заметное действие на организм [Исаев С. Г., 1985; Отспачук И. Ф. и др., 1985; Царалунга А. В., 1985]. Во всяком случае показано [Ец Г. Е., 1955], что биологическая активность летучих фракций лука и чеснока сравнима с биологической активностью тканевых соков из этих растений, хотя, по-видимому, концентрация действующего начала в тканевых соках неизмеримо выше. М. М. Дмитриев (1983) установил, что летучие выделения («пары») из растворимых веществ кедра сибирского, пихты и ели сибирской в концентрациях 0,1 мг/м^3, характерных для условий хвойного леса, выраженно стимулировали сердечно-сосудистую и иные системы организма, особенно при физической нагрузке. По данным М. Б. Разумович (1981), летучие фитонциды чеснока, лука и черемши оказывают на организм влияние, подобное действию симпатомиметических препаратов. Л. З. Гейхман (1981) считает, что летучие БАВ растительного происхождения являются стимуляторами или ингибиторами различных физиологических функций организма, причем летучие и нелетучие фракции одного и того же растительного препарата часто оказывают разнонаправленное действие. Я. С. Лещинская (1982, 1983, 1985) установила благоприятное влияние фитонцидов на динамику мозгового кровообращения и на сердечно-сосудистую систему. Низкие дозы ряда летучих фитонцидов положительно влияли в эксперименте на функции печени [Чекман И. С. и др., 1982], а также при хронических воспалительных заболеваниях легких [Остапчук Н. Ф., 1981, 1983]. Свежеприготовленные летучие фракции фитонцидов оказывали положительный эффект при туберкулезе легких и бронхоэктазиях [Герасимов А. И., 1966].

Имеются также сведения о способности летучих фитонцидных препаратов благоприятно влиять и на состояние иммунитета. А. В. Колодин (1979, 1981) наблюдал, что ингаляции препарата, содержащего летучие фракции чеснока, оказывали профилактическое действие при последующем интраназальном заражении мышей культурой патогенного стафилококка. По данным И. М. Макарчука и соавт. (1981), БАВ растительного происхождения в дозах, соответствующих содержанию в воздухе над растениями,

способствовали повышению бактерицидной активности кожи и уменьшению числа аутобляшкообразующих клеток в крови у людей, длительное время находящихся в закрытых помещениях. Авторы трактуют это как свидетельство в пользу повышения реактивности организма.

Эфирные масла как своеобразные концентраты фитонцидов эфиромасличных растений также обладают способностью действовать на организм в виде летучих фракций в низких концентрациях. Л. Д. Юрчак и А. К. Гордеев (1982), Ю. А. Акимов (1985) показали, что эфирные масла широко распространены в летучих фитогенных выделениях. Биологическую активность летучих фракций эфирных масел выявили В. В. Кривенко и соавт. (1981), исследовавшие действие летучих фракций определенных композиций эфирных масел на здоровых людей. В течение 20 дней 2 раза в день по 15 мин 70 практически здоровых операторов, работающих в закрытых помещениях при некоторых психоэмоциональных перегрузках и гиподинамии, подвергали действию фитоионоаэрозоля с помощью аппарата ФИТОН-1. При этом уменьшался уровень общего холестерина крови, β-липопротеидов, нормализовывалась концентрация холестерина, связанного с белками. Кроме того, были обнаружены изменения со стороны свертывающей системы крови: нормализовывались показатели протромбинового индекса, свободного гепарина и фибриногенов. О. Е. Талдыкин (1981) при испытании аэрозолей трех эфирных масел в летных тренажерах выявил уменьшение количества аутофлоры кожи. Это зависело, по мнению автора, скорее не от снижения общей обсемененности воздуха, а от возрастания бактерицидности кожи.

Таким образом, нам представлялось целесообразным изучить действие на иммунную систему некоторых эфирных масел (монарды и базилика) при введении их непосредственно в дыхательные пути, в том числе в виде летучих фракций в низких концентрациях. Эти эфирные масла способны, как было показано выше, оказывать иммуномодулирующее действие при парентеральном введении, как правило, при внутрибрюшинном и в некоторых случаях — при внутримышечном введении. Однако эти данные свидетельствуют главным образом об определенных иммуномодулирующих потенциях использованных масел, поскольку вряд ли можно рассчитывать на такой способ их клинического применения. В практическом плане большее значение имеет, по-видимому, испытание эфирных масел как средств воздействия через дыхательные пути — в виде аэро-

золей или летучих фракций. Однако такой подход ставит и другие вопросы и прежде всего — каким образом указанные масла будут действовать на сенсибилизацию дыхательных путей, а также на локальную иммунную систему легких, обладающей, как известно [Kaltrteider H. B., 1976; Ganguly R., 1977], определенной автономией. Кроме того, немаловажным представляется значение патологических процессов в легких, главным образом воспалительных, при введении эфирных масел в организм через дыхательные пути. Исходя из этого, мы изучали действие эфирных масел монарды дудчатой и базилика эвгенольного на иммунную систему, иммунорегуляторную активность легких и сенсибилизацию дыхательных путей при введении этих масел в виде аэрозольных ингаляций, заливок в трахею и при воздействии летучих фракций у нормальных крыс и морских свинок и у крыс с экспериментально вызванным воспалительным процессом в легких.

Состояние иммунной системы на фоне интратрахеальных вливаний эфирного масла монарды. Мы оценивали состояние Т-системы иммунитета по результатам внутрикожных проб с ФГА-П, а также изменение показателей первичного и вторичного иммунного ответа при интратрахеальной иммунизации Т-зависимым антигеном — эритроцитами барана.

Под легким эфирным наркозом у крыс линии Wistar с помощью микрометра измеряли толщину подушечки задней левой лапы и после этого внутрикожно вводили 100 мкг ФГА-П в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Спустя 24 ч (также под наркозом) снова замеряли толщину подушечки задней лапы и полученную разницу расценивали как выраженность реакции на ФГА. Для оценки иммунного ответа крысам также под легким эфирным наркозом внутритрахеально с помощью зонда вводили суспензии ($2 \cdot 10^9$) эритроцитов барана в 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия. Выраженность иммунной реакции оценивали на 7-е сутки (пик ответа, определенный в предварительных экспериментах) по титру агглютинирующих антител, в том числе 2-меркаптоэтанолустойчивых (7 S), а также по кожной реакции ГЗТ на предварительное (за сутки) введение в подушечку задней правой лапы $1 \cdot 10^8$ эритроцитов барана в 0,1 мл раствора с измерением толщины подушечки лапы (см. выше). Для внутритрахеальных заливок использовали водно-масляную эмульсию монарды, озвученную на дезинтеграторе (3—4 мин) при амплитуде 18 мкм; 0,1% и 0,05% эмуль-

сию в объеме 0,2 мл (соответственно 0,5 н 1 мг/кг) вводнли животным в трахею через зонд под легкнм эфирным наркозом.

Выяснилось, что внутритрахеальные вливання 0,5% водной эмульснн эфирного масла монарды в дни −11, −8, −6, −5 и −1 по отношенню ко дню оценкн кожной реакции на ФГА-П не влнялн на результаты пробы, т. е. на функциональную активность Т-системы иммуннтета. Вместе с тем увеличение концентрации масла в эмульснн до 0,1% (т. е. повышение вводнмой дозы до 1 мг/кг) сопровождалось значнмым возрастаннем выраженности кожной реакции на ФГА (табл. 8).

Таблица 8. **Влияние внутритрахеальных заливок водной эмульсии эфирного масла монарды на функциональную активность Т-системы и иммунорегуляторную активность легких**

Концентрация масла	Кожная реакция ГЗТ, мм	Уровень агглютининов, (ln обратной величины титра)		Кожный ФГА-тест, мм
		общие	2-меркаптоэтанол устойчивые	
Контроль	0,67±0,1	1,67±0,62	0	0,42±0,05
0,05%	0,56±0,06	2,21±0,5	0	0,29±0,05
0,1%	0,45±0,04	0,96±0,16	0,27±0,16	0,77±0,05

Залнвки в трахею 0,5% водной эмульсин масла монарды не влняли на показателн первнчного иммунного ответа на эритроциты барана, введенные непосредственно в дыхательные пути. Практически не изменялись ни уровень антител, ни выраженность реакцнн ГЗТ. Однако, как и в случае с ФГА-тестом, увеличение концентрации масла до 0,1% при той же схеме введення масла, сопровождалось появлением в кровн 2-меркаптоэтанолустойчнвых антнтел прн сохраненнн одннакового с контролем уровня общнх гемагглютининов и практическн нензменной реакцин ГЗТ.

Такнм образом, местное воздействие эфирного масла монарды в концентрации 0,05% при 5-кратном внутритрахеальном введении практически не влияло ни на актнвность Т-системы, нн на иммунорегуляторную актнвность легких в отношенин первичного иммунного ответа на корпускулярный Т-завнсимый антиген. Вместе с тем увелнченне концентрацнн масла в эмульсин до 0,1%, т. е. повышение вводимой однократной дозы до 1 мг/кг, сопровождалось значимой стимуляцией общей функциональной ак-

тивности Т-системы, документируемым усилением кожной реакции на поликлональный Т-митоген ФГА и стимуляцией синтеза Т-зависимых 7 S-антител.

Влияние ингаляционного введения аэрозоля эфирных масел на развитие сенсибилизации дыхательного тракта. Исследовали влияние эфирных масел базилика и лавра на сенсибилизацию морских свинок к яичному белку.

Свннок сенснбилнзнровалн однократным подкожным введеннем 0,1 мл 25% свежепрнготовлениого раствора яичного белка. На 12-й день со дня сенсибнлизацни жнвотным вводнлн нngаляцнонным путем разрешающую дозу антигеиа. Выраженность аллергической реакции оценнвалн по частоте дыхаиня [Wanner A., 1982], фнксируемой на кимограмме. Предварительио перед введеннем разрешающей дозы антигена жнвотных подвергали контрольной ингаляцнн нзотоническнм раствором хлорида иатрия и также определяли частоту дыхаиня.

Эфнрные масла вводнли животным опытных групп нngаляцнонным путем в вνде аэрозоля 1% водной эмульснн, обработанной предварнтельно на дезннтеграторе, Ингаляцнн масламн проводнлн по 20 мнн ежедневио в течение 3 дней, начниая со дня сенснбнлнзацни.

Оказалось, что ингаляционное введение яичного белка предварительно сенсибилизированным морским свинкам сопровождалось развитием анафилактической реакции средней степени выраженности без гибели животных. Частота дыхания у особей контрольной группы резко возрастала (до 184±28 в минуту при нормальной частоте 124±19) уже на 1-й минуте после введения разрешающей дозы антигена в дыхательные пути. Пик частоты дыхания отмечался на 3-й минуте (200±25), к 9—11-й минуте этот показатель возвращался практически к норме (128±16). Следует отметить, что непосредственно ингаляция не вызывала сколько-нибудь заметного сдвига в частоте дыхания, о чем свидетельствовали результаты анализа кимограмм после введения изотонического раствора хлорида натрия указанным способом.

Вместе с тем у животных, сенсибилизированных яичным белком, которых одновременно с сенсибилизацией и в течение двух последующих дней подвергали ингаляциям эфирного масла базилика, не отмечалось признаков анафилактической реакции в ответ на ингаляционное введение разрешающей дозы антигена. Частота дыхания у животных этой группы практически не изменялась и не отличалась от исходной (на 3-й минуте — 105±10 при исходной частоте 110±5).

В группе животных, обработанных по такой же схеме водной эмульсией масла лавра, внешние признаки анафилактической реакции были выражены в меньшей степени,

чем в контроле, и в большей — по сравнению с группой морских свинок, подвергнутых воздействию масла базилика. Частота дыхания также достигала максимума на 3-й минуте после введения разрешающей дозы антигена (155 ± 14), однако максимальный показатель был в среднем несколько ниже, чем в контроле, и выше по сравнению со средней частотой в группе морских свинок, обработанных маслом базилика.

Таким образом, 3-кратное ингаляционное введение аэрозоля эфирного масла базилика сопровождалось практически полным подавлением анафилактической реакции в ответ на введение антигена непосредственно в дыхательные пути. Эфирное масло лавра проявляло сходную активность, однако менее выраженную.

О механизме этого явления трудно делать какие-либо определенные заключения, однако, по-видимому, в данном случае имело место не столько воздействие маслами на реагирующий аппарат дыхательных путей (тучные клетки слизистой оболочки бронхов, гладкомышечная мускулатура, баланс нейрогуморальной регуляции бронхиального тонуса и др.), снижающее их реактогенность, сколько влияние на антителообразование. Действительно, ингаляции эфирных масел прекращали за 10 дней до воспроизведения аллергической реакции, что вряд ли позволяет предположить столь длительный эффект подобного рода. Вместе с тем ранее было показано, что введение эфирного масла базилика одновременно с иммунизацией активно влияет на иммунный ответ, в частности на продукцию антител. По-видимому, в данном случае подавлялась продукция сенсибилизирующих антител, способных фиксироваться на мембранах тучных клеток и базофилов, т. е. антител, относящихся к классу иммуноглобулина E и субкласса G_4. Это предположение представляется наиболее вероятным, хотя прямых доказательств мы не имеем.

Существенным представляется то, что эфирные масла, будучи введенные в дыхательные пути, оказались способными активно влиять (как и в предыдущих опытах) на иммунный ответ при внелегочном введении антигена.

Действие летучих фракций эфирных масел на состояние иммунной системы и иммунорегуляторную активность легких

Представляло интерес исследовать воздействие на иммунную систему предельно низких концентраций изучен-

ных ранее эфирных масел через дыхательные пути, а именно летучими фракциями в составе вдыхаемого воздуха.

Эксперименты проводили на крысах лиинии Wistar. Состояиие Т-системы оценнвали по выражениости кожиой реакции иа 100 мкг ФГА-П. Определяли способность коитрольных и подопытиых животиых развивать первичный н вторичиый иммуииый ответ на виутривениое введеиие эритроцитов бараиов. Кроме того, оцеиивали иммуиорегуляторную функцию легких по первичиому и вторичиому ответу иа сходиую дозу эритроцитов бараиа, вводимую в дыхательные пути или виутрнвеино. Выражениость иммуииого ответа определяли по уровию гемагглютнннрующих аитител в сыворотке крови, включая 2-меркаптоэтаиолустойчнвые аитнтела и по кожиой реакции ГЗТ.

Эксперимеиты проводнли иа иормальиых крысах, а также на крысах с экспернмеитальным воспалительиым процессом в легких, вызваиным введеиием в трахею иииородиого тела (капроиовой лески). У нормальиых особей эфириое масло монарды использовали в виде паров летучнх фракций. Для этого животных помещали в специальиую камеру небольшого объема, где путем свободиого испареиия прн комнатиой температуре создавалась коицеитрация летучих фракций монарды около 50 мг/м^3. Содержание действующего агеита в воздухе определяли косвенио, для чего взвешивали иебольшой объем масла, помещениый на специальиый иоситель до и после процедуры, и полученную разиицу соотиосилн с объемом камеры. Хотя такой метод является весьма приблизительиым, ои дает определеииое представлеиие о порядке величины концентрации действующего иачала в воздухе. Животные находнлись в камере 40—50 мин. Всего проводили 7 н 12 процедур.

Оказалось, что пребывание в атмосфере с летучими фракциями масла монарды приводило у нормальных животных при 7-кратном воздействии к некоторой стимуляции функциональной активности Т-системы иммунитета по результатам теста с ФГА, средний уровень которого в опытной группе составил $0{,}56 \pm 0{,}04$ мм, а в контрольной — $0{,}42 \pm 0{,}05$ мм ($p < 0{,}05$, по U-критерию Вилкоксона—Манна—Уитни).

Для исследования показателей первичного иммунного ответа крыс иммунизировали под легким эфирным наркозом интратрахеальным введением через зонд суспензии эритроцитов барана ($2 \cdot 10^9$ клеток) в 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия. Оценку ответа проводили на 7-е сутки после иммунизации. Оказалось, что пребывание подопытных животных в атмосфере, содержащей летучие фракции эфирного масла монарды в дни −2, −1, 0, +1, +2, +3 и +4 по отношению к дню внутритрахеальной иммунизации, практически не влияло ни на гуморальный, ни на клеточный первичный иммунный ответ.

Для воспроизведения вторичного иммунного ответа крыс реиммунизировали спустя 2 нед после первичной им-

мунизации той же дозой эритроцитов барана интратрахеально. Через 7 дней оценивали выраженность ответа по тем же критериям — уровню антител и выраженности кожной реакции ГЗТ. Оказалось, что 12 процедур с пребыванием животных в атмосфере, содержащей летучие фракции масла монарды, проведенные в те же дни по отношению к дню первичной иммунизации (как указано выше) и в дни −2, −1, 0, +1 и +2 по отношению к дню интратрахеальной ренммунизации, также не влияло на реакцию ГЗТ (0,32±0,04 мм против 0,48±0,1 мм в контроле) и на выраженность гуморального компонеита иммунного ответа (ln титра общих гемагглютнинов у подопытных животных составил 2,99±0,68; 1,38±0,5 — в контроле, $p>0,05$).

Исследовали также влияние вдыхания летучих фракций масла монарды на реакцию в ответ на внутривенную иммунизацию корпускулярным антигеном после предварительного его внутритрахеальиого введения. Ингаляционные процедуры проводили по такой же схеме, как и при изучении вторичного иммунного ответа, за исключением того, что внутритрахеальную реиммунизацию заменяли внутривенным введением той же дозы антигена. По полученным даиным, эфирное масло в данных условиях опыта не оказывало какого-либо действия на клеточный компонент иммунной реакции. Выраженность реакции ГЗТ у животных опытной группы оценивалась в 0,12±0,06 мм против 0,07±0,04 мм в контрольной группе (разница незначима). По общему титру антител группы также не различались. Вместе с тем обнаружилась отчетливая разница в уровне 2-меркаптоэтанолустойчивых антител (7 S), ln обратного титра которых у крыс, подвергнутых действию летучих фракций масла монарды, составил 5,62±0,6 (3,32±0,3 у интактных животных, $p<0,01$).

Таким образом, летучие фракции эфирного масла монарды при ингаляционном введении в концентрации 50 мг/м³ практически не влияли на иммунорегуляторную активность легких нормальных крыс в отношении как первичного, так и вторичного иммунного ответа на корпускулярный Т-зависимый антиген. Вместе с тем отмечалась некоторая стимуляция активности Т-системы иммунитета: небольшое увеличение кожной реакции на ФГА и стимуляция выработки Т-зависимых 7 S-антител при иммунном ответе на внутривенную иммунизацию. Итак, как и при введении эфирных масел в виде аэрозолей, а также интратрахеальных заливках, вдыхание летучих фракций в не-

больших концентрациях у клинически здоровых животных сопровождалось некоторым увеличением функциональной активности Т-системы без изменения состояния локальной иммунной системы легких.

Следующую серию опытов проводили на крысах линии Wistar с экспериментальным воспалительным процессом в легких, вызванным введением в трахею инородного тела. Во-первых, представлялось существенным определить не влияет ли и если влияет, то каким образом, воспаление в дыхательных путях и легких на действие летучих фракций эфирных масел, поступающих в организм через воспаленные дыхательные пути, на иммунную систему. Во-вторых, интересно было выяснить, действуют ли эфирные масла на измененное состояние иммунологической реактивности.

Активность иммунной системы оценивали по выраженности кожной реакции на ФГА и уровню первичного иммунного ответа на интратрахеальную или внутривенную иммунизацию эритроцитами барана в дозе $2 \cdot 10^9$ (см. выше). Дополнительно определяли в селезенке количество прямых антителообразующих клеток методом локального гемолиза в агаровом геле по Ерне.

Экспериментальный воспалительный процесс в легких крыс вызывали введением под легким эфирным наркозом в трахею капроновой нити диаметром 0,3 мм и длиной 3 см. На 10-, 30- и 60-е сутки с момента введения нити животных забивали и оценивали состояние воспалительного процесса в легких по результатам гистологического исследования парафинированных срезов, окрашенных гематоксилин-эозином.

Ингаляции летучими фракциями эфирных масел монарды и базилика осуществляли в специальной камере вместимостью 0,42 $м^3$. Эфирные масла в небольшом количестве (0,2—0,3 мл) на носителе (поливинилформаль) взвешивали и помещали в специальный дозатор, через который прокачивали воздух в течение 10—15 мин. Воздух из дозатора поступал непосредственно в камеру с животными, причем для каждой камеры проводили замеры объемной скорости потока воздуха. Крыс держали в камере в течение 40 мин ежедневно. После процедуры носитель с эфирным маслом опять взвешивали и таким образом определяли расход эфирного масла и рассчитывали содержание его в воздухе. Средняя концентрация летучих фракций масла монарды составляла $91,7 \pm 7,2$ $мг/м^3$, а масла базилика — $20,2 \pm 0,16$ $мг/м^3$. Всего животным проводили по 16 процедур с эфирным маслом монарды и 7 или 16 процедур с эфирным маслом базилика в зависимости от срока воспалительного процесса в легких.

У животных контрольных групп проводили сходные процедуры, однако без внесения эфирного масла в дозатор. Введение нити и контрольные ингаляции проводили одновременно с таковыми у животных опытных групп и по аналогичным схемам. Показатели иммунного ответа и состояние Т-системы иммунитета оценивали у особей соответствующих групп одновременно.

Введение капроновой нити в трахею крыс сопровождалось развитием на 10-е сутки сливной дольковой брон-

хопневмонии, характеризующейся наличием катарального или катарально-гнойного бронхита с лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрацией, очаговой десквамацией бронхиального эпителия и интерстициальными воспалительными изменениями в перибронхиальной альвеолярной ткани (отек, преимущественно макрофагально-лимфоидная инфильтрация межальвеолярных перегородок). Пролиферативные процессы не были выражены. Отмечались снижение первичного гуморального иммунного ответа по количеству прямых АОК в селезенке, уровню антител в сыворотке крови (ln $1{,}91 \pm 0{,}8$ против $5{,}69 \pm 0{,}06$, $p < 0{,}05$), уменьшение выраженности клеточных иммунных реакций (уровень ГЗТ $0{,}026 \pm 0{,}019$ мм против $0{,}19 \pm 0{,}02$ мм, $p < 0{,}01$), а также падение общей функциональной активности Т-системы иммунитета по результатам кожных проб с ФГА ($0{,}176 \pm 0{,}04$ против $0{,}52 \pm 0{,}08$ мм, $p < 0{,}001$).

В этих условиях ежедневное 7-разовое пребывание животных в атмосфере, содержащей летучие фракции эфирного масла базилика, сопровождалось тенденцией к стимуляции гуморального компонента первичного иммунного ответа. Несколько возрос уровень общих агглютининов ($t = 1{,}91$) и количество прямых АОК селезенки ($t = 2{,}0$). Вместе с тем уровень устойчивых к 2-меркаптоэтанолу (МЭ) антител (ln $0{,}41 \pm 0{,}27$), уровень ГЗТ ($0{,}05 \pm 0{,}02$ мм) и выраженность кожного ФГА-теста ($0{,}142 \pm 0{,}03$) остались без изменений. Гистологически у крыс этой группы регистрировалось усиление альтеративно-экссудативных изменений, проявлявшееся увеличением плотности клеточной инфильтрации перибронхиальной и альвеолярной ткани, возрастанием доли нейтрофилов в инфильтратах.

Таким образом, на ранних сроках экспериментального воспалительного процесса в легких (острое течение) воздействие летучими фракциями эфирного масла базилика сопровождалось некоторой стимуляцией гуморального иммунного ответа без изменения клеточных реакций и общей функциональной активности Т-системы. Патоморфологически регистрировались несколько бо́льшая по сравнению с контрольной группой распространенность процесса и усиление пролиферативного компонента воспаления.

На 30-е сутки воспаления в легких животных контрольной группы гистологически отмечались гнойный бронхит, абсцедирующая бронхопневмония, в некоторых случаях бронхоэктазии. Процесс характеризовался выраженными альтеративно-экссудативными и пролиферативными реакциями (участки клеточной пролиферации, начальная

фиброзная трансформация). Крыс этой группы ежедневно помещали в атмосферу, содержащую летучие фракции эфирных масел, с 8-го дня после введения инородного тела в трахею и до последнего дня перед забоем. Регулярные ингаляции летучих фракций эфирного масла монарды у крыс с 30-суточным воспалением приводили к некоторым изменениям иммунорегуляторной активности легких. В частности, введение корпускулярного антигена непосредственно в дыхательные пути сопровождалось большей выраженностью гуморального первичного иммунного ответа: ln обратного титра общих гемагглютининов составил $3,04 \pm 0,86$ против $0,59 \pm 0,39$ в контроле ($p < 0,05$). Наблюдалась также тенденция к увеличению числа прямых АОК в селезенке. Однако не было зарегистрировано изменений в реакции ГЗТ и в функциональной активности Т-системы ($0,475 \pm 0,05$ мм против $0,41 \pm 0,03$ мм в контроле).

Несколько иные результаты были получены в опытах на крысах с 30-суточным воспалительным процессом в легких, подвергнутых воздействию летучих фракций эфирного масла базилика. Отмечалась значимая стимуляция функциональной активности Т-системы иммунитета. Кожная реакция на ФГА оценивалась $0,7 \pm 0,08$ мм ($0,41 \pm 0,03$ мм в контроле, $p < 0,05$). Кроме того, отмечалось усиление формирования ГЗТ в ответ на внутривенное введение корпускулярного антигена ($0,31 \pm 0,03$ против $0,05 \pm 0,012$ мм в контроле, $p < 0,001$). Активность гуморального иммунного ответа при этом не изменялась.

Гистологически у крыс, подвергнутых действию эфирного масла монарды, 30-суточный воспалительный процесс в легких был более разнообразен (по сравнению с таковым в контроле). У некоторых особей он характеризовался суппуративным бронхитом с абсцедирующей бронхопневмонией и выраженными альтеративно-экссудативными и пролиферативными процессами, т. е. наблюдались изменения примерно такие же, как в контроле. Вместе с тем у части животных отмечался менее распространенный и менее выраженный воспалительный процесс: катаральный бронхит, бронхопневмония с меньшими альтеративно-экссудативными и более выраженными пролиферативными реакциями.

В группе животных, подвергнутых действию летучих фракций эфирного масла базилика, воспалительный процесс в легких носил менее выраженный характер по сравнению с таковым в контроле. У большинства крыс наблюдался катаральный бронхит с умеренными альтера-

тивио-экссудативными изменениями. В одном случае отмечались бронхоэктазии и в одном случае — абсцедирующие бронхоэктазы. У особей с бронхоэктазамн выявлялись преимущественно пролиферативные реакции: метаплазия бронхиального эпителия в многослойный плоский, значительная клеточная пролиферация, перибронхиальное развитие соединнтельной ткани.

У крыс 60-суточный экспернментальный воспалительный процесс в легких характеризовался преимущественно развитием абсцедирующих бронхоэктазов, распространенной абсцедирующей бронхопневмонией, выраженнымн альтеративно-экссудативнымн и пролиферативными изменениями. Ингаляции летучими фракциями эфирных масел в этих группах начинали за 20—25 дней до забоя и проводили ежедневно.

Воздействие летучих фракций эфирного масла монарды приводило к значимой стимуляции функциональной активности Т-системы иммунитета, документированным значительным усилением ФГА-реакции ($0{,}65 \pm 0{,}09$ мм против $0{,}44 \pm 0{,}04$ мм в контроле, $p < 0{,}05$) и преимущественной стимуляции синтеза Т-зависимых 2-МЭ-устойчивых антител при внутритрахеальной иммунизации (ln обратного титра $1{,}9 \pm 0{,}09$ против $0{,}23 \pm 0{,}09$ в контроле, $p < 0{,}05$). Вместе с тем эфирное масло монарды в этих условиях практически не влияло иа иммунорегуляторную активность легких, ни в отношении синтеза общнх антител, нн реакции ГЗТ.

Летучие фракции эфнрного масла базилика на 60-е сутки воспаления практическн не влияли на состояние функциональной активности иммунной системы ии по показателям, характеризующим Т-систему иммуннтета, ни по параметрам системного иммунного ответа на корпускулярный антиген. Гистологически в легких иекоторых животных с 60-суточным процессом, подвергнутых воздействию масла монарды, регистрировались измененння, сходные с таковыми в контроле: абсцедирующие бронхоэктазы, абсцедирующая бронхопневмония с выраженными альтеративно-экссудативными и пролиферативными реакциями. Однако у части жнвотных процесс носил менее тяжелый характер: катаральный бронхит, очаговая интерстициальная бронхопневмония, характеризующаяся преимущественно умеренно выраженными альтеративно-экссудативными изменениями.

Равным образом при ингаляциях летучих фракций эфирного масла базилнка эвгенольного иногда распростра-

ненность и выраженность воспалительного процесса в легких не отличались от таковых в контроле. Однако в некоторых случаях процесс носил менее выраженный характер и наблюдались преимущественно пролиферативные реакции.

Итак, можно отметить, что пребывание крыс в атмосфере, содержащей летучие фракции эфирных масел монарды дудчатой или базилика эвгенольного, сопровождалось определенными изменениями состояния общей иммунной системы и иммунорегуляторной активности легких. Конечный эффект действия масел весьма различался, наблюдались также различия в действии одного и того же масла в зависимости от степени развития экспериментального воспалительного процесса в легких.

Летучие фракции эфирного масла монарды в подострой фазе воспаления (30 сут с момента введения лески) преимущественно влияли на иммунорегуляторную активность легких в направлении стимуляции антителообразования, а на более поздних сроках (хроническая фаза) стимулировали Т-систему, не затрагивая иммунорегуляторный аппарат легких. Эфирное масло базилика эвгенольного, напротив, преимущественно действовало на ранних сроках воспаления. Причем в острой фазе воспаления проявлялась тенденция к стимуляции антителопродукции, а в подострой стимулировались клеточные реакции (способность отвечать на ФГА и формировать ГЗТ).

Из особенностей воспалительного процесса при действии летучих фракций эфирных масел можно отметить несколько меньшую выраженность воспаления в подострой и хронической фазах, а также несколько более высокую активность пролиферативных реакций под действием масла базилика.

Таким образом, показана возможность стимуляции функциональной активности Т-системы, а также модуляции иммунного ответа путем воздействия через органы дыхания летучими фракциями эфирных масел монарды и базилика в достаточно низких концентрациях. Такая стимуляция могла быть осуществлена у животных как с нормальными легкими, так и с воспалительным процессом.

Резюмируя, можно отметить следующее. При введении эфирного масла монарды (и частично масла базилика) непосредственно в дыхательные пути эффект действия отличался принципиальной однонаправленностью независимо от использованных форм введения (внутритрахеальных вливаний озвученной водной эмульсии, ингаляции аэрозо-

ля или воздействия летучими фракциями в составе вдыхаемого воздуха). Эффект этот характеризовался действием преимущественно на общую Т-систему практически без изменения локального иммунного аппарата легких у нормальных животных и стимуляцией антителопродукции при экспериментальном воспалении. Складывается впечатление, что указанные эфирные масла достаточно активно проникают в организм через аэрогематический барьер и действуют непосредственно на иммунокомпетентные клетки и органы, а не опосредованно — через легкие.

Возможность общей иммуномодуляции при введении соответствующих препаратов непосредственно в органы дыхания продемонстрирована в работе Н. Е. Алексеевой (1983). При интратрахеальной или внутрибрюшинной иммунизации мышей супраоптимальной дозой эритроцитов барана внутритрахеальное введение азатиоприна сопровождалось подавлением накопления сывороточных гемагглютининов. На этом фоне 4-кратные ингаляции левамизолом, проведенные до иммунизации, сопровождались восстановлением исходного уровня антител в ответ на интратрахеальную иммунизацию. У нормальных животных ингаляции левамизола не вызывали изменений выраженности иммунного ответа. Эфирные масла монарды и базилика в проведенных нами опытах оказывали сходное действие в отношении антителопродукции — стимулировали в определенных условиях сниженный антительный ответ у животных с экспериментальным воспалением в легких.

Существенной представляется возможность стимуляции функции Т-системы путем применения летучих фракций эфирного масла монарды, поскольку используемые концентрации весьма низки, т. е. значительно снижена возможность побочных реакций. Кроме того, применение масла в таком виде проще, нежели парентеральное его введение, и может быть использовано для групповых процедур, в том числе и для профилактики заболеваемости при сезонном снижении активности Т-системы в холодные периоды года, особенно у жителей Севера, при неблагоприятных условиях труда и др.

Характерно, что введение исследованных эфирных масел непосредственно в дыхательные пути не оказывало какого-либо заметного аллергизирующего действия, поскольку при многократных воздействиях аллергические реакции не отмечались. Напротив, как показано выше, эфирное масло монарды довольно выраженно подавляло сенсибилизацию к высокоаллергизирующему яичному белку. Воз-

можно в этом проявлялось стимулирующее действие на Т-систему, контролирующей, как известно, выработку сенсибилизирующих реагиноподобных антител [Петров Р. В., 1982; Southill J., 1981].

Следует отметить, что использование нами концентрации летучих фракций масел монарды и базилика совпадали с концентрациями летучих фитонцидов, оказывавших положительное действие на некоторые органы и системы в опытах Л. З. Гейхмана (1981, 1985), который с помощью аппарата «Аэрофит» исследовал воздействие на организм человека хвойных фитонцидов в концентрации 0,1—2 г/м³.

У больных после инфаркта миокарда исследовали также действие летучих фитоорганических веществ в концентрации 0,1—1 г/м³. Результаты у большинства больных были положительными: урежались или исчезали приступы стенокардии, нормализовалось артериальное давление, улучшались общее состояние и сон, отмечалась положительная динамика ЭКГ [Ефремов В. Ф. и др., 1985].

И. С. Чекман и Л. Г. Голотый (1985) показали, что композиция эфирных масел мяты, лаванды и шалфея в дозе 3,33 г/м³ при ежедневном ингаляционном введении экспериментальным животным не оказывала отрицательного воздействия на внутренние органы и кровь, не проявляла аллергизирующего действия. Напротив, была отмечена стимуляция функционального состояния нервной системы и обменных процессов.

Активное иммунорегуляторное действие летучих фракций эфирных масел, по-видимому, не случайная находка. По мнению М. Т. Дмитриева (1983), летучие растительные бактерицидные вещества, к которым можно отнести и эфирные масла, иными словами фитонциды, являются так называемыми натурстимулянтами, т. е. веществами природного происхождения, обладающими выраженным стимулирующим биологическим действием.

Действие на иммунную систему крыс с экспериментальным иммунодефицитом

Иммунодефицит, вызванный длительным воспалительным процессом в легких. Мы исследовали курсовое воздействие летучих фракций эфирных масел монарды дудчатой и базилика эвгенольного на состояние иммунной системы и иммунорегуляторной активности легких в условиях 3-месячного экспериментального воспалительного процесса в легких.

Состояние иммунной системы у крыс оценивали по параметрам вторичного иммунного ответа на субоптимальную дозу корпускулярного тимусзависимого антигена (эритроцитов барана), а также по результатам кожного теста с поликлональным Т-митогеном (ФГА-П). Иммунорегуляторную активность легких оценивали по выраженности вторичного иммунного ответа на внутритрахеальное введение антигена. Экспериментальный воспалительный процесс индуцировали путем введения в трахею инородного тела — капроновой нити диаметром 0,3 мм. На 90-е сутки оценивали состояние иммунной системы и воспалительные изменения в легких.

Для оценки вторичного иммунного ответа животных иммунизировали двукратно с промежутком в неделю путем внутривенного введения взвеси эритроцитов барана ($5 \cdot 10^7$) и спустя еще одну неделю определяли в крови уровень антител в реакции гемагглютинации с оценкой суммарного пула антител и титра 2-МЭ-устойчивых антител. Способность к формированию клеточных иммунных реакций определяли по уровню повышенной чувствительности замедленного типа (ГЗТ) — кожной реакции подушечки задней лапы через 24 ч после внутрикожного введения $1 \cdot 10^8$ эритроцитов барана. Для оценки иммунорегуляторной активности легких проводили внутритрахеальную иммунизацию по аналогичной схеме эритроцитами барана в дозе $5 \cdot 10^7$ (методика иммунизации приведена выше).

Функциональную активность Т-системы иммунитета определяли по результатам внутрикожного теста с ФГА-П, введенного в количестве 100 мкг также в подушечку задней лапы крысы. Степень утолщения лапы определяли через 24 ч. Ингаляции эфирными маслами опытным группам животных проводили ежедневно в течение 18 дней, предшествовавших забою. Крыс помещали в специальную камеру вместимостью 0,08 $м^3$, куда подавали летучие фракции эфирных масел. Животных контрольных групп одновременно с особями опытной группы содержали в таких же камерах, но без эфирного масла.

Оказалось, что результатом 3-месячного воспалительного процесса в легких явилось значительное угнетение состояния иммунной системы (табл. 9). В частности, отмечались выраженное снижение поликлонального ответа Т-лимфоцитов на митоген ($p<0{,}001$), весьма значительное подавление и гуморального ($p<0{,}001$) иммунного ответа. Вместе с тем иммунорегуляторная активность легких существенно не изменилась.

Гистологически в легких крыс с воспалением, не подвергавшихся действию эфирных масел, отмечался гнойный бронхит, иногда — нагноившиеся бронхоэктазы. Регистрировались выраженные альтеративно-экссудативные изменения, характеризовавшиеся массивной инфильтрацией перибронхиальной и альвеолярной ткани лимфоидно-макрофагальными элементами с большой примесью полинуклеаров. В ряде случаев выявлялись микроабсцедирование легочной ткани, метаплазия бронхиального эпителия в многослойный плоский, клеточная пролиферация, выраженное склерозирование. В этих условиях 18-кратное пребывание

Таблица 9. **Вторичный иммунный ответ и поликлональная реакция Т-лимфоцитов у крыс, с 3-месячным экспериментальным воспалением в легких, подвергавшихся воздействию летучими фракциями эфирных масел монарды и базилика**

Инородное тело в трахее	Способ введения антигена	Воздействие эфирных масел	ГЗТ, мм	ln обратного титра антител		ФГА-реакция, мм
				общих	2-МЭ-устойчивых	
—	и/т — и/т	—	0,17±0,05	2,5±0,55	0	0,51±0,1
—	в/в — в/в	—	0,19±0,02	7,93±0,3	5,31±0,23	0,45±0,03
+	и/т — и/т	—	0,07±0,02	2,83±0,33	0,27±0,15	0,26±0,036
+	и/т — и/т	Монарды	0,08±0,03	2,35±0,4	0,73±0,2	0,75±0,12
+	и/т — и/т	Базилика	0,09±0,03	3,16±0,89	0,99±0,65	0,43±0,06
+	в/в — в/в	—	0,07±0,03	4,77±0,35	2,07±0,47	0,18±0,06
+	в/в — в/в	Монарды	0,5±0,05	5,62±0,34	3,61±0,55	0,71±0,04
+	в/в — в/в	Базилика	0,32±0,02	4,15±0,38	1,38±0,43	0,47±0,026

животных в атмосфере, содержащей летучие фракции масла монарды в концентрации 30—40 мг/м³, сопровождалось значительной стимуляцией, выше нормального уровня, показателей клеточного иммунного ответа на внутривенную иммунизацию ($p<0,001$) и поликлональной реакции на Т-митоген ($p<0,01$). Несколько возрастал титр 2-МЭ-устойчивых антител ($p<0,05$). Вместе с тем средний уровень общих антител оставался без изменений.

Гистологически у крыс, подвергавшихся действию масла монарды, в легких отмечалась весьма полиморфная картина — от катарально-слизистого бронхита до нагноившихся бронхоэктазов. В случае бронхоэктазов в окружающей ткани легких выявлялись обширные участки макрофагальной инфильтрации, клеточной пролиферации, а также фиброзная трансформация. Эпителий бронхов иногда был метаплазирован. По сравнению с контролем отмечались торможение альтеративно-экссудативных изменений, преимущественно пролиферативные реакции.

Эфирное масло базилика оказывало несколько менее выраженное стимулирующее действие на иммунную систему (см. табл. 9): меньше увеличивалась способность Т-лимфоцитов к поликлональной стимуляции ($p<0,01$), а также способность к формированию клеточных иммунных реакций ($p<0,001$). Каких-либо изменений в активности антителообразования отмечено не было. В легких при этом выявлялись катарально-слизистый бронхит, перибронхиальный склероз, преимущественно макрофагальная инфильтрация с небольшой примесью полинуклеаров, клеточная пролиферация бронхиального эпителия в многослойный плоский. По сравнению с контролем отмечалась несколько меньшая выраженность альтеративно-экссудативных изменений.

При достаточно активном действии на общую иммунную систему, летучие фракции обоих изученных эфирных масел не оказывали сколь-нибудь заметного влияния на иммунорегуляторную функцию легких в отношении вторичного иммунного ответа на субоптимальную дозу корпускулярного антигена. Не изменялись по сравнению с контролем ни уровень ГЗТ, ни способность к выработке антител.

Вместе с тем следует отметить, что у животных из этих групп, т. е. иммунизированных интратрахеально, происходила стимуляция функциональной активности Т-системы иммунитета, причем практически в тех же соотношениях, что и у крыс, у которых оценивали системную иммун-

ную реакцию (выше при воздействии летучих фракций масла монарды и ниже — базилика).

Таким образом, выраженный вторичный иммунодефицит, развившийся у крыс в результате длительного воспалительного процесса в легких, в значительной степени корригировался после курсового воздействия летучими фракциями эфирного масла монарды в низких концентрациях в составе вдыхаемого воздуха. Возрастали общая функциональная активность Т-системы, способность к формированию клеточных иммунных реакций и выработке Т-зависимых 2-МЭ-устойчивых-антител. Летучие фракции эфирного масла базилика также стимулировали поликлональную реакцию Т-лимфоцитов и клеточные иммунные реакции, однако в меньшей степени, чем масла монарды.

Воспалительный процесс в легких крыс, подвергавшихся действию летучих фракций эфирных масел, по сравнению с контролем характеризовался меньшей выраженностью и распространенностью (особенно при действии летучих фракций масла монарды), торможением альтеративно-экссудативных реакций и активацией пролиферативных процессов.

Иммунодефицит, вызванный тимэктомией. Исследовали иммунорегуляторную активность летучих фракций эфирных масел монарды дудчатой и базилика эвгенольного на модели экспериментального иммунодефицита крыс, вызванного тимэктомией половозрелых особей. У некоторых животных тимэктомию сочетали с длительным экспериментальным воспалительным процессом в легких.

Состояние иммунной системы оценивали по параметрам вторичного иммунного ответа на субоптимальную дозу $1 \cdot 10^7$ в 1 мл эритроцитов барана, а также по результатам кожного теста с ФГА-П. Тимэктомию проводили у крыс в возрасте около 2 мес. Состояние иммунной системы оценивали спустя 9 мес после тимэктомии и сравнивали с таковой в контроле (ложнооперированные животные). У некоторых особей спустя 6 мес после операции индуцировали экспериментальиый воспалительный процесс в легких путем введения в трахею иинородного тела и иа 90-е сутки оцеиивали состояние иммунной системы и воспалительные изменения в легких (схема иммунизации и методы оценки иммунного ответа описаны выше). Ингаляции эфирными маслами проводили опытным группам животных ежедневно в течение 18 дней, предшествовавших забою, по методике, описаииой в предыдущем разделе.

Оказалось, что через 9 мес после удаления тимэктомии развились некоторые изменения в состоянии иммунной системы, проявляющиеся нарушениями вторичного иммунного ответа на субоптимальную дозу корпускулярного Т-зависимого антигена; снижение по сравнению с нормой ГЗТ

($p<0{,}05$) и образования Т-зависимых 2-МЭ-устойчивых антител. Кроме того, регистрировалась несколько повышенная по отношению к нормальному уровню кожная ФГА-реакция ($p<0{,}001$).

Экспериментальный воспалительный процесс в легкнх у тимэктомированных животных проявлялся на 90-е сутки после введения лески значительно более выраженными нарушениями со стороны иммунной системы. Отмечались весьма значительное подавлеиие ГЗТ (более, чем в 20 раз по сравнению с нормальным уровнем, $p<0{,}001$), снижение титра общих антиэритроцитарных антител ($p<0{,}01$) и Т-зависимых 2-МЭ-устойчивых антител ($p<0{,}001$). Кроме того, была значительно снижена поликлональная реакция Т-лимфоцитов по результатам ФГА-пробы ($p<0{,}05$). Гистологически 90-суточный воспалительный процесс в легких тимэктомированных крыс проявлялся гнойным бронхитом, абсцедирующей бронхопневмонией, иногда нагноившимися бронхоэктазами.

Отмечалась гиперплазия бронхиального эпителия, в просвете бронхов выраженный гнойный экссудат, в легочной ткани обширные участки лимфоидно-макрофагальной и полинуклеарной инфильтрации, участки клеточной пролиферации, фиброзной трансформации, метаплазия бронхиального эпителия в многослойный плоский, обширное склерозирование с участками полинуклеарной инфильтрации в соединительной ткани.

Курсовое воздействие летучими фракциями эфирных масел монарды и базилика у тимэктомированных животных без экспериментального воспаления практически не сказывалось на параметрах вторичного иммунного ответа. Летучие фракции ни масла монарды, ни базилика существенно не изменяли ГЗТ и уровень антител (общих и 2-МЭ-устойчивых). Вместе с тем отмечалось снижение выраженности ФГА-пробы у тимэктомированных животных, подвергнутых действию летучих фракций эфирных масел, причем, если фракции масла монарды снижали функциональную активность Т-системы до нормального уровня ($0{,}47\pm0{,}04$), то эфирное масло базилика практически полностью подавляло в этих условиях кожную ФГА-реакцию.

В случае, когда регулярному пребыванию в атмосфере, содержащей летучие фракции эфирного масла монарды, подвергались тимэктомированные крысы с длительным воспалением дыхательных путей и легких, регистрировалось весьма выраженное возрастание активности иммунной системы по сравнению с таковой у животных соответствую-

щей контрольной группы (воспаление без каких-либо воздействий). Так, значительно повышалась способность к формированию клеточных иммунных реакций — ГЗТ ($0{,}44 \pm 0{,}029$ мм против $0{,}02 \pm 0{,}01$ мм, в контроле, $p < 0{,}001$) практически до уровня, свойственного нормальным нетимэктомированным крысам без экспериментального легочного воспаления. Существенно возрастал титр суммарного пула антиэритроцитарных антител, образующихся в ответ на двукратную иммунизацию ($p < 0{,}05$), также до нормальных цифр. До нормального уровня увеличивалась способность Т-лимфоцитов реагировать на митоген ($0{,}51 \pm \pm 0{,}069$ мм, $p < 0{,}02$ по отношению к животным с легочным воспалением, не подвергавшимся действию летучих фракций масла). Вместе с тем не отмечалось сдвигов в уровне Т-зависимых 2-МЭ-устойчивых антител ($p > 0{,}05$). Гистологически в легких животных этой группы регистрировался катарально-слизистый бронхит с мононуклеарной экссудацией в просвете бронхов. Эпителий был отечен, частично десквамирован. Наблюдались выраженная макрофагальная инфильтрация перибронхиальной ткани, участки клеточной пролиферации и фиброзной трансформации, гиперплазия перибронхиальных лимфоидных фолликулов, умеренно выраженные альтеративно-экссудативные проявления, преимущественно пролиферативные изменения. По сравнению с контролем выявлялись меньшая распространенность воспалительных изменений, торможение альтеративно-экссудативных реакций, проявляющееся практически полным отсутствием полинуклеаров в составе клеточных инфильтратов, значительно менее выраженный склероз тканей.

Несколько иные результаты были получены в опытах на тимэктомированных крысах с экспериментальным воспалением в легких, подвергавшихся воздействию летучих фракций эфирного масла базилика. Хотя отмечалась статистически значимая стимуляция формирования клеточного иммунитета ($0{,}165 \pm 0{,}006$ мм, $p < 0{,}001$), однако не до нормальных величин ($p < 0{,}05$) и в значительно меньшей степени, чем у крыс, вдыхавших летучие фракции масла монарды ($p < 0{,}01$). В отличие от монарды летучие фракции масла базилика в данных условиях опыта (т. е. при длительных сроках воспаления у тимэктомированных животных) подавляли образование общих гемагглютининов ($p < 0{,}02$) при неизменном уровне 2-МЭ-устойчивых антител. Однако у крыс этой группы отмечалась значительная стимуляция реакции Т-лимфоцитов на поликлональный

Т-митоген ($p<0,05$), которая возрастала до нормального уровня.

В легких животных этой группы регистрировались катарально-слизистый и иногда гнойный бронхит, характеризующийся гиперплазией и частичной десквамацией бронхиального эпителия, отеком слизистой оболочки, наличием нейтрофильного экссудата в просвете бронхов. В альвеолярной ткани отмечались очаги массивной лимфоидно-макрофагальной инфильтрации, участки клеточной пролиферации и фиброзирования. По сравнению с контролем наблюдались менее выраженные альтеративно-экссудативные изменения со значительным уменьшением доли полинуклеаров в составе клеточных инфильтратов, несколько более выраженные пролиферативные процессы.

Таким образом, тимэктомия у половозрелых крыс сопровождалась нарушениями нормального баланса отдельных звеньев иммунной системы с угнетением клеточных иммунных реакций и способности к выработке Т-зависимых антител, а также с возрастанием выше нормального уровня поликлонального ответа Т-лимфоцитов на митоген. Летучие фракции эфирных масел монарды и базилика в этих условиях практически не влияли на показатели вторичного иммунного ответа, однако масло монарды нормализовало функциональную активность Т-лимфоцитов, а масло базилика почти полностью подавляло эту активность.

Сочетание тимэктомии и экспериментального воспалительного процесса в легких на 90-е сутки сопровождалось значительным подавлением практически всех исследованных звеньев иммунного ответа. В этих условиях курсовое воздействие летучими фракциями масла монарды оказывало весьма выраженное нормализующее действие. Влияние эфирного масла базилика проявлялось в небольшой стимуляции клеточных иммунных реакций, нормализации поликлонального ответа Т-лимфоцитов и подавлении синтеза антител. Следовательно, летучие фракции исследованных эфирных масел в условиях длительного воспаления оказывали положительное воздействие (особенно летучие фракции монарды) на иммунную систему даже в отсутствие вилочковой железы.

Иммунодефицит, вызванный введением антитимоцитарной иммунной сыворотки. Исследовали действие летучих фракций эфирных масел монарды и базилика на экспериментальный Т-иммунодефицит крыс линии Wistar, вызванный введением иммунной сыворотки против Т-лимфоцитов.

Сыворотку получали от кроликов, иммунизированных взвесью тимоцитов крыс в количестве $1,5 \cdot 10^8$ 4 раза с недельными интервалами. Полученную сыворотку многократно адсорбировали отмытыми эритроцитами и тканью печени крыс. Такая сыворотка в разведении 1 : 32 действовала цитотоксически на 91% клеток вилочковой железы. Сыворотку замораживали и хранили в морозильнике до использования. Т-иммунодефицит воспроизводили у крыс с массой тела 160—180 г двукратным подкожным введением 1 мл цельной сыворотки с интервалом в один день.

Состояние иммунной системы оценивали методами, описанными в предыдущих разделах по параметрам вторичного иммунного ответа на субоптимальную дозу эритроцитов барана, и по выраженности кожной реакции на введение 100 мкг ФГА-П. Первичную внутривенную иммунизацию крыс проводили на следующий день после последнего введения антитимоцитарной сыворотки (АТС), реиммунизацию — спустя 7 сут. Ответ оценивали на 14-е сутки после первичной иммунизации. Ингаляции летучими фракциями эфирных масел (по схемам, описанным выше и в тех же диапазонах концентраций) начинали также на следующий день после введения АТС. Всего было проведено по 12 процедур.

В результате двукратного введения АТС отмечалось значительное угнетение вторичного иммунного ответа на Т-зависимый антител (табл. 10), в частности, формировалась ГЗТ ($p<0,001$) и синтезировались Т-зависимые антитела ($p<0,001$). Уровень общих антител был снижен ($p<0,05$), но это снижение было не столь значительным. Кожная реакция на Т-митоген, тестированная спустя 2 нед после введения АТС (т. е. одновременно с оценкой параметров вторичного иммунного ответа), оказалась нормальной. В этих условиях 12-кратные ежедневные ингаляции летучими фракциями эфирного масла монарды сопровождались значимой стимуляцией клеточного звена иммунного ответа ($p<0,01$). Вместе с тем средний уровень общих антител в этой группе уменьшился ($p<0,05$), выраженность

Таблица 10. **Параметры вторичного иммунного ответа и поликлональной реакции Т-лимфоцитов на митоген у крыс с иммунодефицитом, вызванным АТС и получавшим ингаляции летучими фракциями масла монарды и базилика**

Введение АТС	Ингаляции	ГЗТ, мм	ln обратного титра антител		Реакция на ФГА, мм
			общих	2-МЭ-устойчивых	
—	—	0,19±0,02	7,93±0,3	5,31±0,23	0,45±0,03
+	—	0,06±0,027	6,33±0,66	2,53±0,52	0,46±0,03
+	Монарда	0,18±0,01	3,8±0,7	1,85±0,8	0,51±0,04
+	Базилик	0,11±0,03	4,0±0,55	2,21±0,25	0,36±0,04

поликлональной реакции Т-лимфоцитов не изменилась по сравнению с контролем.

Летучие фракции эфирного масла базилика вызывали у крыс с иммунодефицитом, индуцированным АТС, только некоторое угнетение образования общих антител ($p<0,05$), заметно не влияя на параметры клеточного ответа и поликлональную реакцию лимфоцитов на ФГА. Таким образом, летучие фракции исследованных эфирных масел оказывали определенное иммуномодулирующее воздействие, однако с несколько иной направленностью по сравнению с предыдущими опытами. В частности, хотя эфирное масло монарды и несколько стимулировало сниженную клеточную реактивность, однако масло и монарды и базилика подавляло антителообразование. По-видимому, различие в эффекте связано, во-первых, с особенностями данного экспериментального иммунодефицита, а во-вторых, возможно, с тем, что животные до первой иммунизации, во многом определяющей уровень иммунного ответа, подвергались только одной ингаляции эфирными маслами.

Глава 5

ДЕЙСТВИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ

Препараты, оказывающие выраженное или умеренное противовоспалительное действие, являются непременной составляющей лечебных комплексов при многих заболеваниях, особенно обусловленных хроническими длительно протекающими воспалительными процессами. Фитонциды способны, помимо антимикробного, оказывать и противовоспалительное действие [Айзенман Б. Е., 1975]. Так, антимикробные препараты из лекарственных растений (новоиманин, сальвин, аренарин, иманин) проявляли противовоспалительную активность [Волосовец П. С., 1979, 1985]. Такой же эффект был выявлен у углекислотных экстрактов календулы, зверобоя и тысячелистника в опытах с экспериментальными ожогами конъюнктивы [Прокопчук А. Ф., 1975, 1979].

При рассмотрении точки приложения растительных антимикробных препаратов складывается впечатление, что многие из них подавляют преимущественно экссудативный компонент воспалительной реакции. По данным М. Ф. Спивак и А. Ф. Суханова (1965), действие препарата чеснока фитонцида в эксперименте на кроликах с дозированным

повреждением кожи ушей при местном применении на ранних сроках проявлялось значительным уменьшением выраженности воспалительного отека и лейкоцитарной инфильтрации. Вместе с тем на более поздних сроках воспаления фитонцидин существенно подавлял макрофагальную инфильтрацию и стимулировал пролиферативные процессы. В. Я. Вытрищак и Н. И. Никитина (1962) экспериментальный воспалительный процесс воспроизводили путем введения кроликам в слизистую оболочку щеки инородного тела (нить с тушью). Ткань возле него инфильтрировали водным раствором смеси лука и чеснока. На поздних сроках (20 сут с момента инициации процесса) отмечали значительное подавление воспалительной реакции.

Однако, по данным М. Я. Спивак (1979), препарат из сока чеснока не проявлял противоэкссудативного действия при экспериментальном асептическом воспалении. Вместе с тем чесночный сок довольно активно влиял на инфекционное воспаление: в разведении 1 : 100—1 : 1000 подавлял развитие стафилококковых абсцессов у кроликов. Такое действие было сходно с эффектом 25 000 ед. пенициллина [Коротков В. М., 1966].

Препарат аренарин (из бессмертника песчанного) и препарат К (из растений семейства сложноцветных) подавляли экссудативный компонент воспалительной реакции при инфекционном воспалении, воспроизводимом путем введения культуры патогенного стафилококка в подушечки лап мышей, а также на модели асептического воспаления [Неграш А. К., 1975]. Некоторые фитонциды и препараты на их основе показали определенный противовоспалительный эффект и в условиях клиник, при различных воспалительных заболеваниях. Так, ингаляции аэрозолей брусничного листа, настойки мирта, настойки хвои оказывали благоприятное противовоспалительное действие при хронических пневмониях [Молотков В. Н., 1981], аэрозоли настойки эвкалипта, травы иссопа, настой зверобоя — при туберкулезе легких, острых и хронических бронхитах и пневмониях [Лушанский С. С. и др., 1981], аэрозоль чеснока — также при хронических бронхитах и пневмониях [Булатов П. К. и др., 1965]. Водный раствор смеси сока лука и чеснока эффективен при нагноительных процессах, в частности при панарициях и флегмонах [Ец Г. Е., 1955]. Фитонцидный препарат из розового масла розанол при приеме внутрь оказывал противовоспалительное действие у больных хроническим холецистоангиохолитом [Галецкая Т. М. и др., 1982].

Эфирные масла как представители фитонцидов определенных видов растений также обладают противовоспалительным эффектом. Так, эфирное масло можжевельника обыкновенного при местном применении оказывало противовоспалительное действие при гнойничковых поражениях кожи [Головко Э. А. и др., 1982]. Смесь 1% эвкалиптового масла и сока чеснока также при местном применении быстро снижали явления острого вирусного воспаления конъюнктивы [Адигезалова-Полчаева К. А. и др., 1981]. Выявлена противовоспалительная активность у эфирных масел некоторых видов полыней, тысячелистника [Таран Д. Д., 1983]. С. К. Боенко и соавт. (1979) обнаружили достаточно высокую противовоспалительную активность у некоторых компонентов эфирных масел, в частности азулена и хамазулена. Исходя из этого, весьма целесообразным представлялось исследовать на наличие противовоспалительной активности набор эфирных масел, изученный нами в предыдущих опытах и особенно масел, продемонстрировавших высокую биологическую активность.

В предварительной группе опытов провели скриннинговую оценку противовоспалительной активности 20 эфирных масел и их компонентов в отношении асептического воспаления (мыши). Кроме того, наиболее активные масла испытали и в опытах с инфекционным воспалением, более близким к реальным условиям воспалительных процессов в клинике. И, наконец, была предпринята попытка определить хотя бы один из компонентов механизма противовоспалительного действия наиболее активных в этом отношении масел.

Действие на асептическое и инфекционное воспаление

Противовоспалительную активность эфирных масел изучали на двух моделях. В первой из них очаг асептического воспаления вызывали в коже мышей введением скипидара, затем в этот очаг вводили раствор стрихнина в дозе, безусловно смертельной для мышей, однако в случае выраженной воспалительной реакции животные не погибали, поскольку токсин не проникал через воспалительный вал. Уменьшение выраженности воспаления сопровождалось повышением процента гибели мышей.

Скипидар в виде 50% раствора на вазелиновом масле вводили внутрикожно в объеме 0,1 мл в боковую поверхность спины. Спустя 24 ч в очаг воспаления микрошприцем инъецировали 0,02 мл 0,1% раствора нитрата стрихнина (DL 100). Мышам 1-й контрольной группы (30 особей) вводили только скипидар и нитрат стрихнина. Животным 2-й контрольной группы (30 особей) за 30 мин до инъекции скипидара и спустя 6 ч после нее вводили внутримышечно референтный

противовоспалительный препарат — смесь гидрокортизона в дозе 0,025 мг/кг и витамина B_6 0,5 мг/кг. Эфирные масла вводили в виде 1% эмульсии на 1% поливиниловом спирте по 0,1 мл внутримышечно (т. е. в однократной дозе 50 мг/кг). Масла вводили 3 раза: 2 раза до инъекции скипидара, в дни —3, —1 и один раз через 6 ч после инъекции скипидара. Противовоспалительную активность оценивали по проценту гибели животных по сравнению с контролем.

Оказалось, что введение безусловно смертельной дозы нитрата стрихнина непосредственно в очаг воспаления приводило к гибели только небольшого числа животных — 7 из 30 ($23,3 \pm 7,8\%$) 1-й контрольной группы. Однако двукратное введение таким мышам референтного противовоспалительного препарата сопровождалось резким увеличением процента гибели (26 из 30 мышей или $86,6 \pm 6,3\%$, $p < 0,001$). Таким образом, использованная модель позволяла достаточно адекватно оценить противовоспалительную активность испытуемых препаратов. Троекратное внутримышечное введение эфирных масел также приводило к статистически значимому повышению относительного количества погибших животных, т. е. эти масла оказывали противовоспалительное действие.

Наиболее активным оказалось эфирное масло лаванды. По активности это масло в использованных дозах приближалось к активности референтного противовоспалительного препарата. Процент гибели мышей, получавших масло лаванды перед введением скипидара и стрихнина, составлял $80 \pm 12,6$ (разница с 1-й контрольной группой высокозначима, $p < 0,001$). Далее по убыванию противовоспалительной активности изученные эфирные масла располагались в следующей последовательности: тяжелое хвойное масло ($70 \pm 17,5\%$, $p < 0,02$ по сравнению с 1-контрольной группой) ажгон, линалилацетат, масло лавра ($65 \pm 13,5\%$, $p < 0,05$), масло монарды ($60 \pm 10,9\%$, $p < 0,01$), изоэвгенол ($60 \pm 15,5\%$, $p < 0,05$), масло базилика ($55 \pm 13,8\%$, $p < 0,05$). Такие эфирные масла, как эвкалиптовое, бархатцевое, фенхельное и гераниевое, вызывали повышение процента гибели мышей до 50 ± 18 (различия с 1-й контрольной группой на грани значимости). И, наконец, эфирные масла полыни лимонной, тмина, петрушки, лофанта, эльшольции, розы, мяты и гладыша не оказывали заметного противовоспалительного действия: процент гибели мышей, получивших нитрат стрихнина на фоне введения этих масел, не превышал 40.

Противовоспалительное действие эфирных масел испытывали и на модели инфекционного воспаления.

Белым беспородным мышам в подушечку задней лапы вводили по 0,08 мл 10^9 взвеси отмытой суточной бульонной культуры патогенного стафилококка 209. В течение 6 сут ежедневно определяли объем лап с помощью специального стеклянного цилиндра. Эфирные масла вводили в виде 0,5% эмульсии в 1% поливиниловом спирте 0,1 мл внутримышечно (т. е. по 25 мг/кг). Масла вводили 3 раза: в день создания очага микробного воспаления и еще 2 раза с интервалом в 2 сут. Животным контрольной группы вводили 1% поливиниловый спирт по аналогичной схеме.

Эфирные масла оказывали определенное противовоспалительное действие, снижая воспалительный отек лап. Различия в среднем объеме лап мышей контрольной и опытной групп наиболее резко проявлялись на 6-й день после заражения культурой патогенного стафилококка, т. е. после троекратного введения масел. Так, средний объем стопы в группе мышей, которым вводили масло монарды, составлял $0{,}112 \pm 0{,}001$ $см^3$ ($0{,}171 \pm 0{,}02$ $см^3$ в контроле, $p < 0{,}05$). Введение эфирного масла лаванды также сопровождалось значимым уменьшением объема инфицированных стоп ($0{,}118 \pm 0{,}02$ $см^3$, $p < 0{,}05$). Остальные изученные эфирные масла (розмарина, базилика, тяжелое хвойное масло) не оказывали выраженного противовоспалительного действия, хотя средний объем инфицированных стоп в этих группах был все-таки ниже, чем у мышей контрольной группы.

Таким образом, многие эфирные масла довольно активно подавляют развитие асептического и инфекционного воспаления. Наиболее активным в отношении асептического воспаления оказалось лавандовое масло, противовоспалительная активность которого приближалась к активности референтного противовоспалительного препарата, хотя, конечно, использованные дозы этого масла значительно превышали эффективные дозы гидрокортизона. Активность эфирного масла монарды в отношении асептического воспаления была не так высока, как масла лаванды, однако при микробном воспалении масло монарды подавляло развитие отека также эффективно, как и лавандовое масло. В данной модели проявлялись не только чисто противовоспалительная активность масла монарды, но и выраженные антимикробные свойства. Эфирное масло базилика в условиях обоих видов экспериментов оказывало не очень выраженное противовоспалительное действие. Противовоспалительная активность тяжелого хвойного масла в модели асептического воспаления была гораздо выше, чем в модели микробного воспаления.

Действие на воспаление, вызванное иммунными комплексами

Воспалительные реакции, вызываемые в тканях различными иммунными комплексами, играют немаловажную роль в патогенезе многих заболеваний. Поэтому подавление воспалительных процессов является непременным условием терапии таких заболеваний. Поскольку в основе повреждения тканей иммунными комплексами и инициации воспалительной реакции лежит главным образом фагоцитоз таких комплексов полиморфно-ядерными лейкоцитами с выделением в окружающую тканевую среду ряда повреждающих лизосомных ферментов [Петров Р. В., 1982], то такие описанные выше свойства эфирного масла монарды, как способность стабилизировать биологические мембраны, а также ингибировать в определенных условиях фагоцитарную реакцию, могут оказаться полезными в плане подавления повреждения тканей иммунными комплексами.

Мы оценивали действие эфирного масла монарды в опытах на кроликах, предварительно иммунизированных БСА. После развития выраженного антительного ответа проводили внутрикожные пробы с БСА и оценивали степень кожной реакции.

Для получения достаточно высокого титра антител против БСА кроликов иммунизировали многократным внутриконъюнктивальным введением БСА. Контрольные внутрикожные пробы проводили на 22-й день от начала иммунизации. Выраженность реакции Артюса оценивали спустя 4—5 ч после внутрикожного введения 1 мг БСА по размеру участка гиперемии в месте введения, а также по степени повреждения кожи (по 5-балльной системе; 5 баллов — наличие некроза в месте введения, 0 — отсутствие какой-либо реакции).

После проведения контрольных проб животных разделили на две группы таким образом, чтобы выраженность кожных реакций в каждой группе была одинаковой. Эфирное масло монарды вводили особям опытной группы в виде 1% эмульсии в твине-80 по 3 мл внутрибрюшинно (10 мг/кг) в течение 4 дней перед проведением кожных проб (дни −3, −2, −1, 0). Кроликам контрольной группы вводили БСА в кожу обеих половин боковой поверхности спины, причем перед тестинъекцией в один из этих участков кожи за 5—10 мин втирали цельное эфирное масло монарды.

Иммунизация БСА сопровождалась развитием выраженного антительного ответа, проявлявшегося довольно значительной местной реакцией в ответ на внутрикожное введение 1 мг БСА. Исходный уровень ответа у кроликов опытной и контрольной группы практически не отличался как по размеру участка гиперемии (1,59±0,24 см в опытной группе и 1,28±0,3 см в контрольной, $p>0,05$), так и

выраженности реакции в баллах (соответственно 3,6±0,55 и 4±0,6). Четырехкратное внутрибрюшинное введение эмульсии эфирного масла монарды по 10 мг/кг сопровождалось у особей опытной группы тенденцией к уменьшению среднего размера гиперемии, развившейся в ответ на внутрикожное введение БСА: средний размер участка гиперемии в опытной группе составил 0,47±0,1 см, в контрольной — 0,81±0,13 см (различия на грани значимости, $t=2,07$). По выраженности реакции разницы между опытной и контрольной группами практически не было (соответственно 1,3±0,3 и 1,75±0,3 балла).

Вместе с тем отмечалась существенная разница в результатах внутрикожных проб у особей контрольной группы в зависимости от предварительного втирания эфирного масла монарды в место инъекции антигена. Так, при оценке реакции через 4—5 ч после пробы средний диаметр гиперемии составил 0,18±0,18 см на участках кожи, подвергнутых действию масла монарды (0,81±0,13 см на необработанных участках, $p<0,02$). Спустя 24 ч после введения БСА в интактных участках кожи реакция сохранялась практически на прежнем уровне (0,78±0,18 см), тогда как в участках, в которые предварительно втирали эфирное масло, не отмечалось никаких признаков воспалительного повреждения.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что эфирное масло монарды при троекратном внутрибрюшинном введении по 10 мг/кг в некоторой (небольшой степени) подавляет повреждение кожи иммунными комплексами. Однако нанесение масла непосредственно на кожу (втирание) за 10 мин до тест-инъекции антигена практически полностью подавляет патологический процесс.

Действие на сосудистую проницаемость

В развитии воспалительной реакции немаловажную роль играет повышение капиллярной проницаемости в очаге воспаления, что, по-видимому, и лежит в основе проявления экссудативного компонента воспалительной реакции. Кроме того, при воспалении повышается и общая сосудистая проницаемость. Представляло определенный интерес оценить влияние некоторых эфирных масел на общую сосудистую проницаемость. Эксперименты проводили на кроликах. Оценивали проницаемость сосудистой сети для белков при введении в кровоток красителя, свя-

зывающегося с альбумином крови. Затем определяли концентрацию красителя через фиксированные промежутки времени.

Краситель (0,2%) синий Эванса (Т-1824) в изотоническом растворе хлорида натрия по 1 мг/кг вводили кроликам внутривенно в течение не менее чем 3 мин, с тем чтобы он успел полностью связаться с сывороточным альбумином. Через 30, 60, 90, 120 и 180 мин забирали по несколько миллиметров периферической венозной крови и определяли степень окрашенности сыворотки на фотоэлектроколориметре. Рассчитывали время выведения из кровотока 50% общего количества красителя по формуле:

$$T_{1/2} = \frac{0{,}693}{K}, \quad K = 2{,}3, \ \lg \frac{100\, D_1 - \lg 100\, D_2}{T_2 - T_1},$$

где $T_{1/2}$ — время выведения из кровотока 50% общего количества красителя; D — оптическая плотность; T — промежуток времени с момента введения красителя.

Используя величину $T_{1/2}$, рассчитывали относительное количество (процент) красителя, выведенного из кровотока в течение часа и в дальнейшем оперировали этой величиной.

Состояние повышенной сосудистой проницаемости моделировали путем создания очага острой воспалительной реакции: животным внутритрахеально вводили $2 \cdot 10^9$ взвесь отмытой суточной бульонной культуры патогенного стафилококка в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Эксперименты проводили спустя 3 сут после заражения. Эфирные масла вводили животным внутрибрюшинно или внутримышечно в виде 0,5—1% эмульсий в 3% поливиниловом спирте по 1—3 мл (по 2—12 мг/кг).

У нормальных кроликов состояние общей сосудистой проницаемости характеризовалось выведением из кровотока за час 19,78±1,05% общего количества красителя. Воспалительная реакция, индуцированная введением в дыхательные пути взвеси культуры патогенного стафилококка, через 3 сут после заражения проявлялась выраженным увеличением сосудистой проницаемости. Среднее количество выводимого за час красителя возрастало до 28,8±±1,55% ($p<0{,}001$ по отношению к нормальной величине).

Внутрибрюшинное введение таким животным 0,5% эмульсии эфирного масла базилика в объеме 3 мл (5 мг/кг) 3 раза в течение 3 дней с момента заражения сопровождалось тенденцией к некоторому уменьшению общей сосудистой проницаемости. Среднее количество выводимого за час красителя составляло 25,3±2,7%. Введение по аналогичной схеме эмульсии эфирного масла базилика интактным кроликам не влияло на общую сосудистую проницаемость: за 1 час в среднем из кровотока выводилось 19,8±1,53% красителя. Эфирное масло монарды, введен-

ное внутрибрюшинно в виде 0,5% эмульсии 2 раза в течение 2 дней, не изменяло изучаемый показатель. Однако увеличение концентрации масла в эмульсии до 1% и введение его уже внутримышечно и в течение 6 дней сопровождались возрастанием общей сосудистой проницаемости для белков: выведение красителя из кровотока составило 38,0±2,42%. Эмульсия эфирного масла лаванды в отличие от остальных изученных эфирных масел несколько снижала общую сосудистую проницаемость у нормальных кроликов (до 10,3±2,5%) при двукратном его введении внутрибрюшинно в виде 0,5% эмульсии (по 5 мг/кг). Однако увеличение числа введений до 6, концентрации — до 1% (10 мг/кг) и изменение способа введения на внутримышечный сопровождались, так же как и в опытах с маслом монарды, возрастанием общей сосудистой проницаемости (27,0±3,5%).

Таким образом, эфирные масла базилика и монарды практически не влияли на общую сосудистую проницаемость у нормальных животных при двукратном внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг. Масло лаванды в таких условиях даже вызывало некоторое уменьшение степени проницаемости. Увеличение однократной дозировки до 10 мг/кг, числа инъекций и изменение способа введения значительно повышали изучаемый показатель (особенно эффективно масло монарды). Следовательно, исследованные нами эфирные масла при определенных условиях способны изменять проницаемость сосудов для белков, т. е. влиять на экссудативный компонент воспалительной реакции. Нам удалось установить, что некоторые эфирные масла обладают достаточно высокой противовоспалительной активностью, поскольку они действовали не на инфекционное воспаление, в котором, возможно, имеет немаловажное значение чисто бактерицидный эффект масел, но и на асептическое воспаление, на модели которого эта активность тестировалась по действию на основную функцию воспалительного очага (отграничение повреждающего фактора).

Противовоспалительная активность эфирных масел, по-видимому, прямо не связана с содержанием в них какого-либо определенного компонента, например, фенола, являющегося одной из основных фракций масла монарды. Так, В. А. Приходько (1981) не выявил какой-либо активности бакучиола, растительного антибиотика фенольной природы, в отношении гнойно-некротического воспалительного процесса, вызываемого внутрикожным введением культуры патогенного стафилококка. Очевидно противовоспалитель-

ная активность эфирных масел, как и ряда других растительных антимикробных препаратов, складывается из суммы биологического действия различных их фракций и обусловливается, в частности, антиоксидантной активностью, способностью стабилизировать лизосомные и цитоплазматические мембраны, активно влиять на сосудистую проницаемость и др. Однако в любом случае способность эфирных масел оказывать наряду с бактерицидным, иммуномодулирующим и гипосенсибилизирующим и противовоспалительное действие имеет, по-видимому, немаловажное практическое значение.

Глава 6

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В УСЛОВИЯХ ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА

Влияние ингаляций эфирными маслами на видовой состав микробной флоры зева животных

Приведем результаты исследований антимикробной активности эфирных масел в условиях целостного организма. Опыты проводили на морских свинках и крысах.

Каждый вид животных распределяли на 4 опытные и одну контрольную группы. Особям 1-й опытной группы проводили ингаляции эфирным маслом монарды в терапевтической дозе (3% от LD_{50}), 2-й — в предельно допустимой дозе (14% от LD_{50}), 3-й — маслом эвкалипта в терапевтической дозе (3% от LD_{50}), 4-й — в предельно допустимой дозе этого масла (14% от LD_{50}), контрольную группу — подсолнечным маслом, на котором разводили эфирные масла монарды и эвкалипта. Ингаляции делали ежедневно по 10 мин в течение 2 мес. Мазки из зева брали до ингаляций и через 1 и 2 мес после начала ингаляций. Идентификацию микробов, выделенных из зева животных, проводили по общепринятым методикам.

Оказалось, что у морских свинок через месяц после начала ингаляций маслом монарды в терапевтической дозе высеваемость эпидермальных стафилококков снижалась на 70%. Через 2 мес из зева этих животных элиминировались кишечные палочки и палочки клебсиеллы пневмонии. У крыс, получавших ингаляции эфирного масла монарды в этой же дозе, характер микрофлоры зева в течение месяца практически не менялся. Однако со 2-го месяца регистрировалось четкое уменьшение высеваемости палочек протея и клебсиеллы пневмонии. В группах животных, получавших ингаляции эфирным маслом эвкалипта и подсолнечного масла, изменений микробного состава зева не наблюдалось.

Интересные результаты были получены при изучении действия на микробный спектр зева предельно допустимых концентраций масла монарды. В первый месяц существенных изменений мы не выявили, а через 2 мес у морских свинок перестали выделяться стафилококки, стрептококки, грамположительные диплококки, палочки протея и палочки клебсиеллы пневмонии. При бактериологическом анализе обнаруживались только грамотрицательные палочки (71,1 %). У крыс в конце курса процедур высеваемость пиогенных стафилококков уменьшилась в 2 раза, а неидентифицированных грамотрицательных палочек — в 6 раз.

Таким образом, ингаляции эфирными маслами монарды и эвкалипта способствуют элиминации из микрофлоры зева животных стафилококков, палочек протея, клебсиелл пневмонии и других видов грамотрицательных палочек, играющих важную этиологическую роль в развитии воспалительных заболеваний у человека.

Действие на мутации бактерий in vivo

Известно, что существует много химических веществ, которые не вызывают мутаций in vitro, но превращаются в активные мутагены при введении их в организм животных и человека [Legator M. S., 1970]. В этой связи мы исследовали мутагенное действие эфирных масел и их фракций in vivo.

В работе использовали методику M. S. Legator (1970). Опыты проводили на белых беспородных мышах. Двухчасовую бульонную гистидинзависимую культуру Salmonella typhimurium 1020, разбавленную изотоническим раствором хлорида натрия в соотношении 1 : 4, вводили по 2 мл внутрибрюшинно белым мышам. Затем внутрибрюшинно вводили 0,1 мл исследуемого вещества. Эти инъекции повторяли через 1 и 2 ч. Через 30 мин после последнего введения мышей забивали, стерильно вскрывали и отсасывали пастеровской пипеткой экссудат из брюшной полости. Экссудат с микробной взвесью разводили стерильным изотоническим раствором хлорида натрия до концентрации бактерий, равной 10^{-1}—10^{-7} клеток, и засевали шпателем на твердую минимальную среду, не содержащую гистидина, и в качестве контроля на среду, содержащую гистидин.

Для сравнительного анализа использовали антибиотики пенициллин и стрептомицин. Контролями служили мутагены нитрозогуанидин и 5-бромурацил. Учитывали также колонии, образовавшиеся в результате спонтанных мутаций. Результаты исследований оценивали по росту мутантных клеток на среде, не содержащей гистидина.

Оказалось, что наиболее часто мутантные клетки выделялись у животных, которым вводили 5-бромурацил в дозе 1000 мкг/мл. При этом количество мутантных колоний

составляло в среднем 79,5±0,6. Нитрозогуанидин так же, как и 5-бромурацил, интенсивно индуцировал образование мутантных клеток (69,7±0,6 колоний). Наименьшее число мутаций зарегистрировано у животных, которым ничего не вводили (спонтанные мутации) или вводили эфирные масла и их фракции. Антибиотики индуцировали мутации в среднем в 1,3±0,03—1,4±0,04 колоний. Растворители эфирных масел (этиловый спирт и изотонический раствор хлорида натрия) практически не проявляли мутагенной активности. В контрольных опытах (высевы на минимальную среду с добавкой гистидина) на всех чашках Петри регистрировался густой рост колоний Salmonella typhimurium 1020.

Таким образом, полученные данные подтвердили результаты генетических исследований in vitro и показали, что эфирные масла и их фракции не обладают мутагенным действием.

Действие на генерализованную инфекцию

Известно, что не все антибактериальные препараты обладают одинаковой активностью in vitro и in vivo. Многие противомикробные средства, хорошо зарекомендовавшие себя в опытах in vitro, теряют терапевтический эффект при введении в организм животных. Резкое снижение бактерицидных свойств этих препаратов происходит за счет комплекса разнообразных причин, среди которых большую роль играют активность биологических жидкостей (сыворотки крови, желудочного сока), инактивация веществами, находящимися в тканях, и др. [Кашкин П. Н. и др., 1970].

Мы изучили антимикробное действие эфирного масла монарды in vivo на генерализованную инфекцию.

Генерализованную инфекцию воспроизводили у белых беспородных мышей. Их разделили на две группы (по 50 особей): опытную и контрольную. Животным опытной группы внутрибрюшинно вводили 1,5 мл $2 \cdot 10^9$ микробных тел на 1 мл Klebsiella pneumoniae, сочетая заражение с введением масла монарды в концентрации 50 000 мкг на каждую мышь. Контроль — введение бактерий без эфирного масла. Результаты учитывали по выживаемости мышей через 18 ч после заражения. Живых и павших особей стерильно вскрывали и делали посев из сердца на МПА агар и мазок-отпечаток из селезенки.

В опытной группе из 50 животных выжило 34 (68,0± ±6,6%). В селезенке мышей этой группы капсульные грамотрицательные палочки были обнаружены в 13,3±4,8%, рост микробов, высеянных из крови мышей, зарегистриро-

ван в 14,2±4,9% случаев. В контрольной группе выжило 16 мышей (32,0±6,60%, $p<0,001$). Микробы в селезенке были выявлены в 54,4±1,04% ($p<0,05$), а в крови — в 58,9±6,96% ($p<0,05$) случаев.

Полученные данные свидетельствуют о том, что эфирное масло монарды губительно действует in vivo на Klebsiella pneumoniae, которая у людей вызывает тяжелые поражения легких. Учитывая это, изучили влияние данного эфирного масла на патогенез лучевой болезни, поскольку экспериментально установлено, что радиоактивное излучение в первую очередь поражает иммунокомпетентные клетки, за счет чего активизируется аутоинфекция и наступает гибель макроорганизма.

Для воспроизведения лучевого поражения белых мышей облучали на рентгенотерапевтической установке в дозе 1000 Р. Опытной группе животных (137 мышей) перед облучением вводили внутримышечно 4 раза в день по 0,1 мл 7% водной эмульсии масла монарды Контрольным особям (167 мышей) масло не вводили.

Оказалось, что средняя продолжительность жизни животных в опытной группе составила 15,7±1,3 дня, а в контрольной — 4,8±0,2 дня ($p<0,001$). В опытной группе мышей срок жизни более 30—50 дней отмечался в 10,9%, а в контрольной — только в 0,6% случаев.

Таким образом, введение животным 7% эмульсии эфирного масла монарды увеличивало продолжительность жизни мышей в 3,2, а выживаемость — в 18,3 раза. Это свидетельствует о достаточно выраженном радиопротективном действии и высокой антимикробной активности изученного масла.

Глава 7
АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Мы установили, что ингибирующее действие эфирных масел на биологические тест-объекты обусловлено деструкцией структурных компонентов клеток, в частности цитоплазматических мембран, и блокированием активности дыхательных процессов. В сублетальных дозах эфирные масла снижают проницаемость мембран и интенсивность аэробного дыхания бактерий. Однако механизм подобного действия на комплекс жизненно важных функций и структур клеток оставался неясным. Для обоснования рабочей гипотезы о механизме действия эфирных масел на биологические мембраны и внутритканевое дыхание были приняты во внимание следующие факты.

Известно, что структура и функциональная активность мембран клеток во многом зависит от степени активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Владимиров Ю. А., 1975]. ПОЛ связано с окислением и деградацией жирных кислот биомембран, что отражается на текучести мембран клеток [Баджинян С. А. и др., 1975; Сторожок С. А., 1983]. Инициирование процессов ПОЛ в митохондриях приводит к резкому повышению протонной проводимости, так называемой утечке мембранного потенциала, неспособности поддерживать фосфорилирующее дыхание, высокоамплитудному набуханию и потере растворимых компонентов матриксного пространства [Архипенко Ю. В. и др., 1975; Казначеев В. П. и др., 1980]. Скорость ПОЛ зависит от температуры и состава фосфолипидов мембран (особенно от степени насыщенности жирных кислот) и присутствия некоторых химических веществ, высокоэффективных даже в небольших концентрациях [Храпова Н. Г., 1981]. К таким веществам относятся природные и синтетические антиоксиданты, влияющие на образование и гибель активных форм кислорода и свободных радикалов [Владимиров Ю. А., 1975; Панасюк Е. Н. и др., 1985]. Природные антиоксиданты обладают высокой антирадикальной активностью, широко представлены в растениях и выполняют функцию защиты от автоокисления [Петрусевич Ю. М., 1975]. Очевидно введение антиоксидантов в организм будет препятствовать диффузии кислорода и инициированию ПОЛ, что повысит стабильность мембран клеток [Садовникова И. П., 1986]. Кроме того, влияние антиоксидантов может отражаться и на активности окислительно-восстановительного процесса в клетке, следствием которого может стать снижение внутритканевого дыхания.

Учитывая изложенное, мы предположили, что эфирные масла могут проявлять антиоксидантные свойства и, воздействуя на процессы ПОЛ, способствовать стабилизации цитоплазматических мембран клеток. Это может иметь существенное практическое значение при разработке методов и средств профилактики и лечения различной патологии, связанной с низкой устойчивостью клеточных мембран.

Антиоксидантные свойства масел in vitro

Нами проведены исследования in vitro по определению антиоксидантной активности эфирных масел.

В видалевские пробирки иаливали по 0,5 мл линетола (окисляемый субстрат): в 1-ю — линетол без добавок; во 2-ю — линетол с до-

бавкой 0,1 мл спиртового раствора известного антиоксиданта β-ионола (10 мг/мл); в 3-ю и последующие пробирки — линетол с добавками 0,1 мл эфирного масла. Растворы в 1-й и 2-й пробирках служили контролем. Растворы в пробирках перемешивали встряхиванием, ставили в водяную баню при 45 °С и барботировали атмосферным воздухом в режиме, обеспечивающем кинетический характер окисления линетола. В моменты времени 0; 15; 30; 45 и 60 мин с начала барботирования из пробирок отбирали пробы по 0,02 мл, которые наносили на калий-йодиую индикаторную бумагу. По времени развития окраски пятна пробы определяли концентрацию перекисей, а следовательно, и интенсивность (скорость) перекисного окисления в пробах. Индикаторной бумагой служили полоски фильтровальной бумаги размером 1×3 см, равномерно пропитанные раствором 0,12 М йодида калия, приготовленного на 1% растворимом крахмале, и высушенные в сушильном шкафу при 40 °С.

Концентрацию перекисей и соответственно скорость перекисного окисления в пробах определяли следующим образом. Отобранную из барботируемого раствора пробу (0,12 мл) наносили на индикаторную бумагу и одновременно с этим включали секундомер. Индикаторную бумагу помещали в атмосферу азота. По секундомеру засекали время развития окраски пятна нанесенной пробы (до начала побурения пятна пробы, которое определяли визуально). Время развития окраски пятна соответствовало концентрации в пробе перекисей и чем оно было меньше, тем выше была скорость перекисного окисления.

Результаты антиокислительной активности эфирных масел оценивали по показателям скорости перекисного окисления линетола с изучаемыми образцами масел по отношению к скорости окисления чистого линетола. Скорость перекисного окисления в пробе с чистым линетолом принималась за единицу. Время развития окраски пятна, нанесенного на индикаторную бумагу, выраженное в десятичных величинах (в минутах), пересчитывали на обратную величину. Получали величину скорости перекисного окисления в этой пробе. Последнюю величину делили на величину скорости перекисного окисления в пробе с чистым линетолом (т. е. скорость перекисного окисления чистого линетола принимали за единицу). Таким образом получали величины относительных скоростей перекисного окисления линетола в пробах с испытуемыми добавками, или коэффициенты антиоксидантной активности эфирных масел и β-ионола, характеризовавшие эффективность антиоксидантного действия изучаемых веществ. Чем меньше по значению величины относительных скоростей перекисного окисления в пробе с добавкой испытуемого вещества, тем значительнее выражены антиоксидантные свойства этого вещества.

Полученные данные показали, что практически все эфирные масла, кроме масла лаванды, проявляли антиоксидантные свойства. Так, скорость окисления линетола на 60-й минуте эксперимента в присутствии масла лавра составила 0,555±0,02 условных единиц (УЕ), что было в 2 раза меньше скорости окисления чистого линетола. Скорость окисления линетола в присутствии эфирных масел укропа, аира, непеты, почули, эльшольции и фенхеля колебалась в диапазоне 0,580±0,01—0,760±0,01 УЕ, т. е. была ниже единицы, принятой за скорость окисления чистого линетола.

Из всех изученных эфирных масел наиболее выраженное антиоксидантное действие проявляли масла лавра, фенкеля, аира, непеты, ректификата мяты, азулена (основного компонента эфирного масла тысячелистника), почули, эльшольции. Эти масла обладали более высокой эффективностью, чем β-ионол. Обогащенная цинеолом фракция вторичного масла лавра и кубовый остаток ладанника проявляли антиоксидантную активность, практически равную таковой β-ионола (соответственно 0,815±0,02; 0,825±0,01 и 0,800±0,02 УЕ, $p<0{,}05$). Остальные образцы (масло монарды, вторичное масло лавра, экстракт ладанника) обладали менее выраженной активностью, чем β-ионола (соответственно 0,895±0,01; 0,905±0,01;, 0,990±±0,04 и 0,800±0,02 УЕ, $p<0{,}05$). Эфирное масло лаванды проявляло прооксидантную активность (1,095±0,02 УЕ).

Таким образом, эфирные масла в подавляющем числе случаев обладают антиоксидантной активностью. Это действие in vitro наиболее выражено у эфирных масел лавра, фенхеля, аира, непеты.

Антиоксидантные свойства масел in vivo

Результаты опытов in vitro показали, что практически все исследованные эфирные масла в той или иной степени проявляли антиоксидантные свойства. Однако известно, что многие БАВ резко снижают или существенно изменяют характер своего действия при введении в организм животных и людей.

Исследоваиия проводилн на крысах-самцах линин Wistar. В течение 3 сут им один раз в день вводилн внутрибрюшниио 0,2 мл исследуемых веществ (эфирных масел в виде озвученной водной эмульсин или цельных, контроль — β-нонол). После окончання курса (на 4-е сутки) крыс забивалн и из печени с помощью хлороформно-метанольной смеси экстрагнровалн липиды. Полученный экстракт нсследовалн на налнчие аитиоксндаитной активиостн in vitro с помощью метода, опнсаиного выше.

Оказалось, что изученные эфирные масла и их фракции и in vivo проявляли антиоксидантную активность. Так, скорость окисления линетола с добавкой экстракта печени крыс, которым вводили 3% эмульсию эфирного масла лавра или 0,1% эмульсию эфирного масла фенхеля, составила соответственно 0,420±0,03 и 0,455±0,12 УЕ, что было в 2 раза меньше скорости окисления чистого линетола. β-Ионол при введении в организм животных не проявлял антиоксидантной активности (1,255±0,18 УЕ).

Наиболее высокий антиоксидантный эффект регистрировался при внутримышечном введении крысам 3% эмульсии эфирного масла лавра, 0,1 и 3% масла фенхеля, 0,1 и 3% масла монарды. Менее выраженная активность наблюдалась у цельных масел или их фракций (тимол, азулен). Способность исследованных масел стимулировать антиоксидантную активность липидов печени не полностью соответствовала антиоксидантной активности этих масел in vitro.

Показатели антиоксидантной активности эфирных масел монарды и фенхеля при введении этих веществ в организм животных были выше результатов, полученных in vitro. Так, скорость окисления линетола с добавкой масла монарды in vitro равнялась 0,895±0,01 УЕ, а in vivo — 0,615±0,07 УЕ ($p<0{,}05$), с добавкой масла фенхеля — соответственно 0,760±0,01 и 0,730±0,01 УЕ ($p<0{,}05$). Эфирное масло лавра проявляло более выраженный эффект in vitro (0,555±0,02 УЕ), чем in vivo (0,705±0,03 УЕ, $p<0{,}05$).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что эфирные масла монарды и фенхеля являются наиболее перспективными веществами для использования в качестве антиоксидантов. Эфирное масло лавра целесообразнее применять в качестве добавок в образцы, не содержащие биологически активных жидкостей или компоненты макроорганизма.

Итак, эфирные масла обладают антиоксидантными свойствами как in vitro, так и in vivo. Эффект снижения скорости окисления липидов in vivo значительнее выражен у разведений эфирных масел (лавра, фенхеля и монарды), чем у цельных масел или их отдельных компонентов. Материалы исследований in vivo подтверждают результаты экспериментов in vitro и свидетельствуют о том, что, возможно, одной из функций эфирных масел, образующихся в клетках растений, может быть антиоксидантная активность, аналогично таковой токоферолов, находящихся в тканях организма человека и животных. Подтверждением этой гипотезы служат данные, полученные при изучении роли витамина Е в обмене веществ.

В последние годы получила признание антиоксидантная теория о биологическом действии витамина Е. Эта теория основана на том, что все липиды тканей животных подвергаются процессу пероксидации, который кинетически сходен с определенным типом автоокисления ненасыщенных липидов. Автоокисление ненасыщенных липидов

запускается свободными радикалами, развивается как цепная реакция и катализируется металлами и другими веществами. Неконтролируемое усиление пероксидации, которое наблюдается при низком содержании или отсутствии антиоксидантов, в частности витамина Е, приводит к массовому разрушению метаболических структур (например, клеточных и внутриклеточных мембран), в состав которых входят липопротеиды [Шатерников В. А., 1974]. Многочисленные экспериментальные данные подтверждают эту теорию. Например, Н. Дат (1962) показал, что при недостатке витамина Е усиливается автоокисление полиненасыщенных жирных кислот. Введение в организм синтетических антиоксидантов уменьшает выраженность симптомов, характерных для авитаминоза Е [Roels O. A., 1967].

По мнению Ю. М. Петрусевича (1975), эвгенол и изоэвгенол, выделенный из базилика эвгенольного, проявляет активность, близкую к антирадикальной активности токоферолов. Автор предполагает, что антиоксиданты выполняют в растениях функцию защиты от автоокисления. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что не только эвгенол и изоэвгенол, содержащие фенолы с метоксигруппой, которые, по мнению Ю. М. Петрусевича (1975), обусловливают их высокую активность в процессах автоокисления, но и практически все эфирные масла в той или иной степени участвуют в регуляции ПОЛ. При введении эфирных масел в организм животных эти вещества не теряют своих антиоксидантных свойств, а продолжают активно влиять на процессы инициирования ПОЛ [Николаевский В. В., Иванов И. К., 1985]. Вводимые в здоровый организм масла снижают интенсивность нормального физиологического окисления липидов, следствием чего могут быть уменьшение ионной проницаемости мембран и изменение уровня метаболизма в тканях.

Практическая реализация антиоксидантного эффекта эфирных масел наблюдается при введении их (в частности, масла монарды) в организм облученных животных. Как известно, ионизирующее излучение вызывает в клетках макроорганизма образование свободных радикалов, которые индуцируют процесс бесконтрольного, неупорядоченного перекисного окисления и, как следствие этого, массовое разрушение липидных включений клеточных мембран. Повышенное содержание в тканях эфирного масла монарды снижает интенсивность ПОЛ и предотвращает разрушение структурных элементов клеток.

Таким образом, эфирные масла играют важную роль в

обмене веществ, выполняя наряду с другими функциями роль биоантиоксидантов. Они регулируют процесс ПОЛ и предохраняют ткани от автоокисления. Это свойство эфирных масел имеет существенное значение для практического здравоохранения, поскольку создает предпосылки для разработки новых высокоэффективных препаратов, действующих по типу токоферолов.

Влияние на эритроциты

Одним из перспективных направлений по использованию эфирных масел в практическом здравоохранении может быть применение этих веществ для профилактики и лечения заболеваний крови, связанных с низкой устойчивостью эритроцитов.

Известно, что при определенных специфических воздействиях внешней среды у людей развивается анемический синдром. Он характеризуется уменьшением эритроцитарной массы, количества эритроцитов, снижением резистентности мембран клеток крови и др. [Газенко О. Г. и др., 1980; Ушаков А. С. и др., 1982; Воробьев Е. И. и др., 1984]. Используемые в настоящее время методы и средства лечения анемического синдрома недостаточно эффективны [Газенко О. Г. и др., 1981].

Установлено, что резистентность клеток во многом зависит от структурных особенностей и функциональной активности их мембран, что в свою очередь взаимосвязано с процессами ПОЛ [Владимиров Ю. А. и др., 1972; Шидловская Т. В., 1985]. При изменении содержания антиоксидантов могут ускоряться процессы ПОЛ в мембранах клеток крови, повышаться их ионная проницаемость и уменьшаться стабильность. Экспериментально показано, что повышенное содержание окислителей (например кислорода) усиливает перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот. Это сопровождается нарушением целостности мембран эритроцитов и снижением их резистентности [Голотин В. Г. и др., 1974; Carolla R. L. et al., 1968]. А. И. Лукаш и соавт. (1979) выявили, что при острой кислородной интоксикации нарушаются структура и функции эритроцитов, а в сыворотке крови появляются аномально высокие концентрации гемоглобина и железа. Введение в организм животных ингибиторов ПОЛ, в частности препаратов мочевины, повышает устойчивость мембран клеток крови, тормозит освобождение гемоглобина и понижает концентрацию железа в сыворотке крови.

Мы предположили, что эфирные масла, проявляющие антиоксидантные свойства, могут снизить скорость активации ПОЛ в эритроцитах и повысить устойчивость мембран этих клеток. Возможно, что именно это будет положительно влиять на интенсивность развития анемического синдрома. Сначала мы изучили действие эфирных масел на стабильность эритроцитов in vitro.

К 250 мл донорской крови, содержащей стандартный консервант $7^б$ в соотношении 1 : 4, добавляли 1—2 мл 0,25% водной эмульсии эфирного масла монарды, перемешивали, 2—3 раза переворачивая флакон. Кровь хранили в холодильнике при 4 °С в течение 2 нед. В аналогичных условиях хранили кровь, содержащую консервант $7^б$, но без эфирного масла монарды (контроль). По истечении указанного срока исследовали устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу: консервированную кровь смешивали с равным объемом хлористоводородной кислоты (pH 2,6; 0,004) и учитывали интенсивность гемолиза эритроцитов по шкале нефелометра ЛМФ-69 через каждые 30 с при постоянном перемешивании и температуре 24 °С.

Присутствие в консервированной крови 0,25% водной эмульсии эфирного масла монарды способствовало уменьшению интенсивности гемолиза наименее стойких («старых») эритроцитов и, не повышая гемолиза основной массы клеток, увеличивало время окончательного гемолиза эритроцитов. Максимальная интенсивность гемолиза в контрольной пробе наблюдалась в течение 3—4 мин. В среднем за 30 с количество эритроцитов в контроле снижалось на 1060 в 1 мкл против 550 в 1 мкл в пробе с эфирным маслом монарды. Кроме того, в контрольной пробе к концу 6-й минуты все эритроциты были гемолизированы, а эритроциты, обработанные эфирным маслом монарды, к этому времени лизировались лишь на 54,4%. Гемолиз эритроцитов в присутствии масла монарды заканчивался к 10-й минуте, что в 2 раза превышало аналогичный показатель в контроле.

Таким образом, эфирное масло монарды повышало устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу и увеличивало срок их жизни в 2 раза.

Следующий этап работы заключался в подтверждении результатов исследований in vivo.

Белых беспородных крыс содержали в специальных герметизированных клетках, куда подавали воздух различного состава. В контрольной клетке был обычный воздух. В клетку № 1 подавали воздух, не содержащий естественных примесей БАВ растительного происхождения, к которым относятся эфирные масла и которые постоянно присутствуют в земной атмосфере (искусственная атмосфера). В клетку № 2 подавали такой же воздух, но с примесью эфирного масла монарды в дозе $0,58 \pm 0,05$ мг/м³. Эта доза не превышала природных

концентраций БАВ в естественной земной атмосфере, содержание которых, по данным М. Т. Дмитриева и соавт. (1984), варьирует в пределах 0,1—5 мг/м³.

Содержание и кормление животных (за исключением разного состава воздуха) были одинаковыми. Опыты проводили в течение 1—3 мес. После окончания эксперимента делали общий анализ крови. Кислотную резистентность эритроцитов оценивали по методу И. И. Гительзона и И. А. Терскова (1959). Концентрацию кислорода (нг-атом/мл) в мышцах животных регистрировали полярографическим методом с помощью твердых платиновых электродов. Состояние трансмембранного потенциала эритроцитов определяли Н-чувствительным стеклянным электродом. Исследования проводили с применением измерительной кюветы, термостатируемой ультратермостатом (УТ-15). Результаты регистрировали с помощью усилителя постоянного тока. Трансмембранный потенциал рассчитывали по изменению pH от значения pH контрольной пробы. Содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов в плазме крыс регистрировали способами, описанными Н. К. Шилиной (1978) и В. А. Костюком (1984).

Оказалось, что количество эритроцитов у животных, содержащихся в условиях искусственной атмосферы, имело тенденцию к снижению по сравнению с таковым у крыс, находившихся в естественной атмосфере (соответственно $4{,}66\pm0{,}28\cdot10^6$ и $5{,}28\pm0{,}21\cdot10^6$/мкл, $0{,}1>p>0{,}05$). Цветовой показатель крови, наоборот, был выше (соответственно $0{,}93\pm0{,}06$ и $0{,}79\pm0{,}05$ ЕД; $0{,}1>p>0{,}05$). В искусственной атмосфере регистрировался более высокий ионный поток калия из эритроцитов ($0{,}60\pm0{,}03$ ЕД), чем в естественной атмосфере ($0{,}37\pm0{,}03$ ЕД, $p<0{,}01$), что, очевидно, приводило к уменьшению мембранного потенциала клеток (соответственно $0{,}25\pm0{,}04$ и $0{,}55\pm0{,}07$ ЕД, $p<0{,}01$).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в искусственной атмосфере, лишенной природных концентраций БАВ, отмечались изменения функциональной активности мембран эритроцитов, что характерно для ранних проявлений анемического синдрома. Одновременно отмечалось нарушение процессов утилизации кислорода в тканях животных. У крыс, содержащихся в обычной атмосфере, концентрация кислорода в бедренных мышцах равнялась $206{,}73\pm9{,}47$, а в искусственной атмосфере — $309{,}86\pm\pm7{,}32$ нг-атом/мл ($p<0{,}01$). Мы предположили, что повышенное содержание кислорода в организме животных может способствовать неспецифическим окислительно-восстановительным процессам, в частности инициированию процессов ПОЛ. Напомним, что количество первичных продуктов ПОЛ в плазме крыс имело тенденцию к повышению в условиях искусственной атмосферы ($1{,}04\pm0{,}07$ $\Delta Д_{233}$ на 1 мл плазмы), в естественной атмосфере ($0{,}92\pm0{,}07$ $\Delta Д_{233}$ на 1 мл плазмы).

Таким образом, содержание животных в условиях искусственной атмосферы сопровождается повышением концентрации кислорода в тканях, что, очевидно, отражается на уровне липидного обмена, в частности, скорости активации процессов ПОЛ. Последнее влияет на стабильность мембран эритроцитов: увеличивается их проницаемость для ионов калия и снижается устойчивость к внешним воздействиям среды. В результате наименее жизнеспособные клетки погибают, а количество эритроцитов в крови падает.

У животных, находившихся в искусственной атмосфере с БАВ, практически все исследуемые показатели были близки к норме или проявляли тенденцию к нормализации. Так, количество эритроцитов в атмосфере с летучими фракциями эфирного масла монарды составляло $4{,}82 \pm \pm 0{,}37 \cdot 10^6$/мкл и не имело значимого различия с аналогичными показателями в условиях естественной атмосферы. Цветовой показатель был ниже и приближался к таковому в условиях естественной атмосферы. Показатель выхода ионов калия из эритроцитов равнялся $0{,}25 \pm 0{,}04$ ЕД, а мембранный потенциал — $0{,}53 \pm 0{,}05$ ЕД. Эти данные практически не отличались от показателей в условиях естественной атмосферы ($p > 0{,}05$).

Интересно отметить, что летучие фракции масла монарды настолько активно повышали устойчивость клеток крови к кислотному гемолизу, что ее показатели достоверно отличались от данных, полученных не только в условиях искусственной атмосферы, но и в естественной.

Концентрация кислорода в тканях крыс, содержавшихся в искусственной атмосфере с добавками эфирного масла монарды, была ниже, чем показатель в атмосфере без биоантиоксидантов. Отмечалась и тенденция к нормализации содержания первичных продуктов ПОЛ в плазме крови.

Таким образом, введение в атмосферу, лишенную природных биоантиоксидантов, летучих фракций эфирного масла монарды действует профилактически на систему крови, предупреждая развитие серьезных нарушений в ее структуре и функции. По-видимому, на основе использования эфирных масел можно разработать эффективные методы профилактики и лечения заболеваний крови, в частности анемического синдрома.

Глава 8

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В ОРГАНИЗМЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Для использования эфирных масел в практическом здравоохранении необходимо знать распределение масел в организме животных и человека [Лысенко И. И., 1985]. Немногочисленные работы [Малеев А. и др., 1970; Зельцфас А. А. и др., 1985; Николаевский В. В. и др., 1980, 1985] свидетельствуют об особенностях распределения эфирных масел в макроорганизме в зависимости от характера вводимого вещества и метода его введения. Так, эфирное масло розы уже через час в большом количестве скапливалось в печени животных, а через 8 ч этот эффект становился наиболее выраженным [Малеев А., 1970]. На основе масла розы был создан лечебный препарат розанол, который с успехом применяется при заболеваниях печени. Очевидно, изучив особенности распределения и других эфирных масел, можно будет рекомендовать их для употребления с учетом того или иного метода введения для получения максимального эффекта.

Распределение эфирного масла монарды в организме белых беспородных мышей мы изучали при внутримышечном и ингаляционном его введении, а также при нанесении его на кожу в смеси с лечебной грязью или в виде мази. Использовали эфирное масло, меченное ^{14}C в процессе фотосинтеза.

Делали ингаляции 0,9% раствором масла монарды на подсолнечном масле по 20 мин ежедневно в течение 3 дней. Их проводили одновременно нескольким животным, содержавшимся в специальной камере. В среднем на одно животное при одной процедуре расходовали до 2 мл раствора масла. Через 2; 6; 24 и 72 ч после последней ингаляции животных забивали (тотальное обескровливание). Исследовали легкие, селезенку, печень и почки. Органы высушивали в течение 48 ч при 55 °С, затем тщательно измельчали, взвешивали, навеску 100—200 мг помещали в счетные флаконы и заливали 10 мл нафталин-диоксанового сцинтиллятора. Для гашения хемолюминисценции пробы выдерживали еще 48 ч при комнатной температуре, затем определяли радиоактивность образцов. Радиоактивность пересчитывали на 100 мг сухой массы ткани соответствующего органа.

При накожной аппликации шерсть на спине животных депиллировали и через 4—5 дней, когда полностью исчезало раздражение, либо наносили на кожу лечебную грязь (около 1 г) с добавлением 1% меченого масла, либо втирали 1% раствор масла монарды на абрикосовом масле. Через 2 ч животных забивали и брали для исследования легкие, печень, почки, селезенку, кровь, а также участок кожи с места нанесения масла.

При парентеральном введении эфирного масла монарды его распределение оценивали другим методом. Неразведенное масло в коли-

честве 0,1 мл вводили внутримышечно. Животных забивали через 2; 4 и 6 ч после введения масла. Для исследования брали кровь, печень, селезенку, почки, легкие, сердце и мышцы в месте введения масла. Органы высушили, растирали и готовили навески по 20 мг, измеряли радиоактивность.

Для исследования распределения эфирного масла при внутримышечном введении на более поздних сроках использовали 25% раствор масла монарды на масле какао. Забой и оценку радиоактивности органов животных проводили через 2; 4; 6; 24; 48 и 72 ч.

При ингаляции маслом монарды через 2 ч после последнего сеанса максимальное количество радиоактивной метки обнаруживалось в легких — 330±24 имп/мин на 100 мг сухой массы. В довольно высоких количествах метка обнаруживалась в печени и почках (соответственно 169±19 и 225±31 имп/мин на 100 мг сухой массы). Радиоактивность образцов селезенки (73,6±18 имп/мин) не намного превышала фоновый уровень (45±18 имп/мин). Через 6 ч после последней ингаляции метка обнаруживалась только в почках, причем в очень небольшом количестве (82,6±19 имп/мин). Уровень радиоактивности остальных органов не превышал таковых показателей.

Через сутки после последней ингаляции радиоактивность в легких, печени, почках и крови практически отсутствовала. Однако радиоактивность селезенки резко возросла по сравнению с таковой на предыдущих сроках и составила 345±36 имп/мин на 100 мг сухой массы. На 4-е сутки радиоактивность селезенки несколько уменьшилась (до 150±36 имп/мин), однако все еще превышала фоновый уровень более чем в 3 раза. Радиоактивность в легких и почках незначительно повысилась (соответственно до 95,2±18 и 74,0±27 имп/мин). В среднем при одной ингаляции вводили приблизительно около 2 мл 0,9% раствора эфирного масла монарды (рассчитано по минутному объему дыхания), что составляет 0,02 мл цельного масла. Мы определили радиоактивность этого количества масла — она составила около 2500 имп/мин. Исходя из этих данных, можно ориентировочно определить (с большой степенью приближения), что через 2 ч после заключительной ингаляции в легких находится около 22% введенного масла, в печени — около 15%, а в почках — около 12%.

Радиоактивная метка активно проникает в организм при нанесении меченого масла монарды на кожу в смеси с лечебной грязью, но не в виде мази. Так, через 2 ч после накожной аппликации 1% раствора масла в смеси с лечебной грязью наблюдалось значительное повышение

(по сравнению с фоном) радиоактивности в легких (106±24 имп/мин на 100 мг сухой массы), крови (110±±38 имп/мин) и особенно в почках (144±29 имп/мин). Нанесение на кожу 1% масла монарды на абрикосовом масле не приводило к проникновению масла во внутреннюю среду организма. Радиоактивность всех изученных препаратов в этих случаях не превышала фоновый уровень.

После однократной внутримышечной инъекции цельного масла монарды включение метки регистрировалось практически во всех изученных органах. В печени, селезенке, сердце и крови уровень радиоактивности составлял 250—300 имп/мин (фоновый 40 имп/мин). В легких отмечался несколько более высокий уровень радиоактивности — 400—450 имп/мин. Максимальное включение метки регистрировалось в почках (3000—6000 имп/мин) и в мышцах в месте введения масла (1000—1500 имп/мин). Характерно, что в почках пик радиоактивности отмечался не через 2 ч после инъекции, как во всех остальных изученных органах, а спустя 4—6 ч.

При внутримышечном введении 25% раствора меченого эфирного масла монарды на масле какао уровень радиоактивности, превышающий фоновый, определялся только спустя 2 ч после инъекции (80—100 имп/мин в крови, печени, селезенке, почках и легких). На сроках 24—48—72 ч включение метки в указанных органах уже не регистрировалось, исключение составили препараты мышц из места введения масла. Довольно значительный уровень радиоактивности наблюдался в этих препаратах на всех изученных сроках. Даже спустя 3 сут в препаратах мышц уровень радиоактивности составлял 220—240 имп/мин.

Таким образом, эфирное масло монарды при ингаляциях проникает в организм экспериментальных животных. Наибольшее его количество обнаруживается в легких, где оно сохраняется в течение по меньшей мере 2 ч. Через 6 ч после ингаляции масло полностью элиминируется из легких. Эфирное масло монарды в организм можно вводить путем накожной аппликации в смеси с лечебной грязью. При этом радиоактивная метка обнаруживается в крови, легких и почках, через которые масло, по-видимому, и элиминируется из организма. Показателен тот факт, что при нанесении на кожу в виде обычной мази эфирное масло практически не всасывается.

При внутримышечном введении цельного масла монарды выделение его из организма происходит, очевидно, преимущественно через почки. Однако метка при этом обна-

руживается в более высоком количестве, чем в других органах. Иная картина распределения масла наблюдается при введении его в мышцы в смеси с маслом какао. В организм при этом поступает, по-видимому, весьма незначительное количество масла (во всяком случае на сроках до 3 сут с момента введения). Возможно, масло сохраняется непосредственно в месте введения.

Глава 9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЗВРЕДНОСТИ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ МОНАРДЫ ДУДЧАТОЙ И БАЗИЛИКА ЭВГЕНОЛЬНОГО

Изучение безвредности эфирных масел монарды и базилика включало в себя определение острой и хронической токсичности.

Прн исследованнях острой токсичности эфириых масел монарды и базилика были использованы 32 белые крысы, 30 белых мышей с массой тела 18—20 г, 30 морских свинок с массой тела 350—400 г. Затравку животных проводили в камерах вместимостью 30 л с винтовыми затворамн. Режим затравкн динамическнй. Скорость поступлеиия нигаляциониой смесн в камеру — 37 л/мин. При затравке животиых маслом моиарды установлеиы следующие уровии токсичности: LD_{50} для белых мышей — 356, для крыс — 467 и для морских свинок — 595 мг на 1 кг массы тела. Для определения средней смертельиой дозы масла монарды при внутрибрюшинном способе введеиия использовали следующие коицеитрации растворов масла монарды на подсолнечном масле: для мышей — 2% раствор, крыс — 20% раствор, морских свинок — 40% раствор. При внутрибрюшинном введеиин масла LD_{50} оказалась следующей: для мышей — 631, крыс — 829 и для морских свинок — 1157 мг/кг.

LD_{50} масла базилика при ингаляциоиииом введеиии определяли иа 28 белых крысах и 30 морских свннках: для крыс — 708 и морских свииок — 920 мг/кг.

Как при внутрибрюшинном, так и ингаляционном способе введения эфирных масел в картине отравления преобладали явления торможения центральной нервной системы. Уже через 10—15 мин появлялись признаки нарастающей слабости, переходящей в полную адинамию. Дыхание становилось поверхностным, едва заметным на глаз, пульс почти не определялся, температура тела снижалась до 26—28 °С. Смерть наступала от остановки дыхания и острой сердечной недостаточности.

Исследование хроннческой токсичиостн эфнриых масел моиарды и базнлика проводили на 130 белых крысах, 130 морскнх свинках и 12 кроликах. Затравку проводили в камерах, использованиых в остром опыте. Животные контрольных групп (крысы и морские свинки) по-

лучали ингаляции подсолнечным и эвкалиптовым маслом, а 50% подопытных животных — маслом монарды и 50% — маслом базилика. Кроме того, 10 кроликам породы шиншилла с массой тела 2,5—3 кг проводили ингаляции ежедневно в течение 10 дней 3% водной эмульсией масла монарды. Цель опыта — выяснить действие микрокапель масла на слизистую оболочку ротовой полости, трахеи и крупных бронхов.

При оценке влияния терапевтической дозы масел монарды и базилика на функцию жизненно важных органов выявлено следующее. При действии масел монарды и базилика на центральную нервную систему методом «открытого поля» разницы в двигательной активности подопытных и контрольных животных мы не обнаружили. Ежедневные ингаляции маслом монарды и базилика в течение 2 мес не приводили к появлению каких-либо патологических изменений на электрокардиограмме (ЭКГ). Частота сердечных сокращений у животных, получавших масло монарды, была в среднем 368 в минуту, а при ингаляции маслом базилика она до начала ингаляций и в конце эксперимента составляла 600 в минуту. У контрольных особей этот показатель колебался в пределах 398—442 в минуту.

У животных, получавших ингаляции маслом базилика, отмечалась тенденция к снижению уровня аланинаминотрансферазы крови с 11 до 5 ед. Однако эти колебания не выходили за пределы нормы для данного вида животных. При ингаляциях маслом монарды содержание этого фермента на протяжении всего эксперимента находилось в пределах нормы и в среднем составляло 11,4±0,5. При оценке влияния масел на функции поджелудочной железы выяснилось, что длительные ингаляции масел монарды и базилика не вызывали нарушений углеводного обмена, о чем свидетельствует нормальное содержание сахара в крови: 7,1 ммоль/л у особей, получавших масло базилика, и 7,5 ммоль/л у животных, получавших масло монарды. Также не обнаружено отрицательного действия этих масел на состав периферической крови и соотношение форменных элементов. Мы не обнаружили сколь-нибудь существенного влияния указанных масел на массу тела животных. За время хронического опыта этот показатель в опытных и контрольных группах составил в среднем 29—30 г.

Таким образом, у крыс и морских свинок, получавших в течение 2 мес ингаляции терапевтическими дозами маслами монарды и базилика, патологических изменений в организме не отмечено.

Мы исследовали влияние предельно допустимой дозы эфирных масел монарды и базилика на функцию жизненно важных органов. Оказалось, что эта доза не изменяла состояние центральной нервной системы животных — их двигательная активность не изменялась. На ЭКГ морских свинок, получивших предельно допустимую дозу масла монарды, отмечено увеличение зубцов *P* и *T*, что свидетельствует о перегрузке правых отделов сердца и соответственно о нарушениях гемодинамики в малом круге кровообращения. Указанные изменения носили компенсированный характер, поскольку частота сердечных сокращений существенно не возрастала. Следует подчеркнуть, что аналогичные изменения зубцов *P* и *T* отмечены на ЭКГ животных обеих контрольных групп. Ингаляции масла базилика не приводили к отклонению показателей от нормы.

О действии продолжительных ингаляций монарды на функцию печени судили по уровню аланинаминотрансферазы крови. Поскольку у особей в опытной группе этот показатель был нормальным, мы сделали заключение об отсутствии токсического воздействия ингаляций предельно допустимой дозой масла монарды на ткань печени. Не обнаружено также патологического влияния длительных ингаляций такими дозами масел монарды и базилика на функцию почек — уровень остаточного азота у крыс не превышал исходных цифр. Этот факт подтверждается также отсутствием патологических примесей в моче (белка, сахара, эритроцитов, цилиндров, лимфоцитов). При указанном воздействии умеренно возрастал (на 11% выше нормы) уровень сахара крови.

При изучении гемограммы не было обнаружено изменений процентного соотношения форменных элементов крови, превышающих пределы нормальных колебаний. Не отмечалось также каких-либо внешних изменений в состоянии животных: они нормально росли и развивались, выглядели здоровыми, шерсть оставалась чистой и гладкой. За время наблюдения у животных опытной группы масса тела увеличилась в среднем на 20—30 г, то же отмечалось и у контрольных особей.

При осмотре слизистой оболочки полости рта, зева и трахеи дефектов эпителия или признаков воспалительных явлений, а также каких-либо изменений секретов не выявлено. Выпот в плевральной и брюшной полости отсутствовал. Легочная ткань воздушная, печень на разрезе обычного цвета, ткани сердечной мышцы упругие, почки на разрезе имеют правильный рисунок, капсула снимается

легко, кровоизлияний во внутренние органы не отмечено. Все органы были взвешены: отклонений в соотношении массы органов и массы тела не обнаружено.

Таким образом, у животных, получивших ингаляции предельно допустимой дозой масла монарды, отмечалась перегрузка правых отделов сердца (аналогичные изменения отмечены в контрольных группах, подвергнутых ингаляциям подсолнечным и эвкалиптовым маслом). Масло базилика изменений на ЭКГ не вызывало. Отмечалось умеренное увеличение уровня сахара крови при воздействии ингаляциями маслами монарды и базилика. Патологических изменений со стороны центральной нервной системы, печени, почек и крови не выявлено. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти эфирные масла относятся к малотоксичным веществам, безопасны для применения в лечебной практике.

Глава 10

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕТУЧИХ ФРАКЦИЙ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

В последние годы отчетливо проявляется тенденция к научным разработкам использования эфирных масел для оптимизации среды обитания людей. Эти разработки биологически обоснованы, технически реализуемы и экологически перспективны. Их результаты могут быть с успехом использованы в районах Крайнего Севера и средней полосе в осенне-зимний период и в других местах, где регистрируется недостаток фитонцидов в воздухе. Однако широкая реализация подобной программы требует глубоких и всесторонних наблюдений, связанных с расшифровкой интимных механизмов взаимодействия летучих фракций БАВ с метаболизмом клеток.

Традиционные методы исследования, используемые для изучения эфирных масел (ингаляции, внутрикожные и внутримышечные введения, воздействия per os и аппликации), не всегда дают возможность провести эксперименты адекватно поставленной задаче и самое главное они не могут реально моделировать отсутствие взаимодействия человеческого организма с летучими фитонцидами в воздухе. Даже в тех случаях, когда вводятся природные концентрации эфирных масел в воздух закрытых помещений, так или иначе нарушается экологический баланс, поскольку

уже сам воздух в этих помещениях содержит фитонциды. Учитывая это, мы предположили, что для обоснования целесообразности оптимизации состава воздуха с дефицитом БАВ при помощи летучих фракций эфирных масел необходимо провести сопоставительный анализ изменений функциональной активности органов и систем макроорганизма в атмосфере, лишенной фитонцидов, с данными, полученными при нахождении животных и людей в обычной атмосфере.

С этой целью мы провели эксперименты, в которых одни животные находились в атмосфере, полностью лишенной БАВ природного происхождения. Эта атмосфера состояла из набора газов, полученных химическим путем, и в процентном соотношении полностью имитировала газовый состав земной атмосферы. Другие животные содержались в такой же атмосфере, лишенной БАВ, но с введением в ее состав природных концентраций эфирных масел. И, наконец, третья группа (контрольная) находилась в обычной земной атмосфере, содержащей природные концентрации БАВ.

Белые крысы линии Wistar и белые беспородные мыши содержались в специальных герметичных клетках с принудительной подачей атмосферы. Скорость прокачки воздуха через клетки с крысами равнялась 9 л/мин, с мышами — 4 л/мин. Уход и кормление животных всех групп были идентичными. Время проведения эксперимента — месяц.

В экспериментах принимали участие и люди. Основная группа состояла из 3 человек (Т., Ф., К.). Эти люди находились в гермообъеме с воздухом, лишенным БАВ, в течение 3 мес. Группа кратковременного пребывания состояла также из 3 человек (П., А., Б.), они находились в гермообъеме в течение 10 дней. Контрольную группу составили лица одного пола и возраста, они находились в естественной атмосфере.

В качестве БАВ было выбрано эфирное масло монарды дудчатой. Выбор этого вещества обусловлен тем, что оно является наиболее перспективным средством для применения в практическом здравоохранении. Летучие фракции масла вводили в атмосферу с помощью специального дозатора в дозах от 0,1 до $50 \cdot 10^{-3}$ мг/л, т. е. в пределах природных концентраций этих веществ в обычной земной атмосфере. В процессе работы исследовали ферментативную активность и состояние иммунитета.

Ферменты изучали с помощью гистологической окраски мазков крови, руководствуясь методическими рекомендациями, разработанными в отделе функциональной морфологии ЦНИИФК Ю. П. Сергеевым, В. В. Язвиковым и Л. А. Уваровым (1982). Определяли активность сукцинатдегидрогеназы NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы, митохондриальной и цитоплазматической α-глицерофосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы и оксибутиратдегидрогеназы. Состояние иммунной системы людей оценивали по активности Т- и В-систем иммунитета и неспецифическим факторам защиты.

Активность Т-системы иммунитета определяли по относительному количеству общих Е-РОК и «активных» Е-РОК (РОК — розеткообразующие клетки) в периферической венозной крови, а В-системы — по относительному количеству ЕАС-РОК в периферической крови, а также по количеству гетерофильных нормальных антител (гемагглютинин-

нов) и концентрации IgG в сыворотке крови. Определяли активность неспецифических факторов защиты по уровню лизоцима в сыворотке крови. Состояние иммунной системы у мышей оценивали по показателям первичного иммунного ответа на субоптимальную дозу тимус-зависимого корпускулярного антигена (эритроциты барана) с оценкой ответа на 2-е сутки после иммунизации, т. е. до наступления его пика.

У мышей в атмосфере, лишенной БАВ, в отличие от особей в обычной земной атмосфере, регистрировалось повышение активности ферментов. Так, показатели сукцинатдегидрогеназы в атмосфере без БАВ равнялись 18,4±0,14 (учет по количеству гранул формазана), 8,6±0,24 в естественной атмосфере ($p<0,01$), NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы — соответственно 7,6±0,20 (4,7±0,12 в норме, $p<0,05$), митохондриальной α-глицерофосфатдегидрогеназы — 7,23±0,15 (5,20±0,16 в норме, $p<0,05$) и т. д. Исключение составила лактатдегидрогеназа, активность которой в условиях земной атмосферы была выше (20,0±0,13), чем в атмосфере без БАВ (18,7±0,5, $p<0,05$). Добавление в состав атмосферы, лишенной БАВ, эфирного масла монарды стимулировало активность дегидрогеназ (сукцинатдегидрогеназа — 19,4±0,35, NAD-зависимая глутаматдегидрогеназа — 7,8±0,17, митохондреальная α-глицерофосфатдегидрогеназа — 8,4±0,25 и т. д.).

Изменение активности окислительно-восстановительных ферментов у крыс было менее выраженным, чем у мышей. У этих животных достоверные различия активности ферментов в атмосфере без БАВ и естественной атмосфере получены только для митохондриальной (соответственно 7,7±0,08 и 9,1±0,74, $p<0,05$) и цитоплазматической (соответственно 19,3±0,06 и 18,3±0,15, $p<0,05$) α-глицерофосфатдегидрогеназ. Видно, что в первом случае регистрировалось снижение активности в атмосфере без БАВ, во втором — ее повышение. Введение летучих фракций масла монарды в атмосферу без БАВ повышало активность исследованных ферментов (кроме цитоплазматической α-глицерофосфатдегидрогеназы, ее активность под воздействием БАВ снижалась).

Было выявлено, что при длительном пребывании людей в атмосфере, лишенной БАВ, увеличивалась активность митохондриальной и цитоплазматической α-глицерофосфатдегидрогеназ (до эксперимента 5,1—7,9, после эксперимента 8,3—9,4), лактатдегидрогеназы (соответственно 4,6—4,8 и 5,5—7,5) и оксибутиратдегидрогеназы (соответственно 4,1—5,2 и 5,5—8,7). Активность сукцинатдегидрогеназы и NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы, наибо-

рот, снижалась. В первом случае эксперимента она колебалась в пределах 16,0—18,6, после эксперимента — 6,9—7,0, во втором случае — соответственно 11,6—12,6 и 9,6—11,5.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в атмосфере, лишенной БАВ, по сравнению с обычной земной атмосферой повышается активность ферментов, связанных с гликолитическими процессами в клетках. Введение в состав атмосферы, лишенной БАВ, летучих фракций эфирного масла монарды в подавляющем большинстве случаев повышало активность окислительно-восстановительных ферментов.

В иммунологических исследованиях установлено, что длительное нахождение людей в атмосфере, лишенной БАВ, отражается на состоянии Т-системы. Так, после 3-месячного пребывания в таких условиях у испытуемых К. и Ф. значительно уменьшилось относительное количество общих Е-РОК (Т-лимфоцитов). Эти показатели снизились у К. с 75 (исходное значение) до 47% (при норме не менее 60%), у Ф.— 79 до 36%, у Т. относительное количество общих Т-лимфоцитов в периферической крови также несколько уменьшилось (с 75 до 66%). Однако этот показатель оставался в пределах нормы. У испытуемых П. А. и Б., пробывших в атмосфере, лишенной БАВ, небольшой промежуток времени, состояние Т-системы иммунитета было в пределах нормы по относительному количеству Е-РОК (соответственно 67, 68 и 71% Т-лимфоцитов). Таким образом, содержание Т-лимфоцитов в периферической крови людей после эксперимента было изменено. Несмотря на крайне небольшое число лиц в группе, разница между средним числом Т-лимфоцитов в основной группе (К., Ф. и Т.) в начале эксперимента статистически значимо превышала данный показатель у этих лиц в конце эксперимента ($76,3 \pm 1,3\%$ против $49,6 \pm 8,7\%$, $p < 0,05$) и наблюдалась тенденция к уменьшению числа Т-лимфоцитов (относительно среднего) в крови лиц группы кратковременного пребывания ($68,6 \pm 1,2\%$ против $49,6 \pm 8,7\%$, $0,1 > p > 0,05$).

Сходная в общих чертах картина наблюдалась и в динамике другого показателя, характеризующего состояние Т-системы иммунитета,— относительного количества так называемых активных Е-РОК. У испытуемого Т. количество этих клеток снизилось почти в 2 раза (с 64 до 33%), а у Ф.— более чем в 4 раза (с 57 до 13%). Следует отметить, однако, что у Ф. данный показатель в конце эксперимента был значительно ниже нормального (25—

40%). У Т. в конце эксперимента он, несмотря на довольно значительное снижение, все-таки оставался в пределах нормы. У испытуемого К. количество «активных» Е-РОК к концу эксперимента даже несколько повысилось — с 36 до 51%. Число «активных» Е-РОК у всех лиц группы кратковременного пребывания после окончания эксперимента не выходило за пределы нормы.

Что касается состояния В-системы иммунитета, то динамика относительного количества В-лимфоцитов в периферической крови у всех обследованных основной группы была сходной: достаточно выраженное возрастание числа ЕАС-РОК (В-лимфоцитов). У испытуемого К. этот показатель возрос в 1,5 раза (с 23 до 36%), у Т.— в 3,8 раза (с 10 до 48%) и у Ф.— в 2 раза (с 22 до 46%). Разница между средним количеством В-лимфоцитов у лиц основной группы до начала и после окончания эксперимента была статистически значима (соответственно 18,3±4,1% и 40,3±3,0%, $p<0,05$). Относительное количество В-лимфоцитов в группе кратковременного пребывания также несколько превысило норму, однако превышение это было выражено незначительно (соответственно 25, 34 и 24% у П., А. и Б.).

Отмечалось некоторое снижение функциональной активности В-системы иммунитета после длительного пребывания людей в условиях атмосферы, лишенной БАВ, документированное по уровню гетерофильных нормальных антител в сыворотке крови. Титр этих антител у всех трех обследованных не превышал 1 : 8. По-видимому, это снижение было незначительным, поскольку другой показатель, характеризующий функциональную активность В-системы иммунитета,— концентрация IgG в сыворотке крови, не выходил за пределы нормы у всех лиц после окончания эксперимента. Этот показатель составил: у К.— 9,36, у Т.— 10 и у Ф.— 11,4 г/л (норма — 9—12 г/л).

И, наконец, при исследовании состояния факторов неспецифического иммунитета выявлено определенное снижение их активности у обследованных лиц. Это выражалось в уменьшении концентрации лизоцима в сыворотке крови. Так, перед экспериментом средний уровень лизоцима в основной группе составил 8,5±0,7 г/л, а после окончания эксперимента — 6,6±0,17 г/л ($0,1>p>0,05$). Уменьшение этого показателя наблюдалось у всех трех испытуемых, причем ниже нормального уровня (до 6,9—6,6 г/л, норма 9—11 г/л).

Таким образом, длительное пребывание людей в атмо-

сфере, лишенной БАВ, сопровождается развитием определенного дисбаланса в системе иммунитета — снижением показателей, характеризующих Т-систему иммунитета, возрастанием относительного количества В-лимфоцитов в крови с одновременным уменьшением их функциональной активности. Кроме того, угнетаются факторы неспецифической защиты. Следует, однако, отметить, что хотя направленность изменений у всех испытуемых была в основном сходной, выраженность этих изменений несколько отличалась. Так, если у обследованного Ф. изменения показателей Т- и В-системы были наиболее выраженными, причем все изученные показатели значительно отличались от нормы (общие Е-РОК — 36%, «активные» Е-РОК — 13%, ЕАС-РОК — 46%), то у испытуемого К. при уменьшении числа общих Е-РОК (47%) количество «активных» Е-РОК оказалось в пределах нормы, а у Т. даже при снижении показателей, характеризующих Т-систему, последние все же оставались в пределах нормы.

Пребывание мышей в течение месяца в атмосфере без БАВ сопровождалось значительным увеличением абсолютного количества ядросодержащих клеток селезенки в среднем до $115{,}8 \pm 17 \cdot 10^6$ клеток, что значимо превышало соответствующий показатель в контроле ($54{,}2 \pm 3{,}16 \cdot 10^6$, $p < 0{,}01$). Введение в атмосферу, лишенную БАВ, летучих фракций эфирного масла монарды приводило к значительному уменьшению количества ядросодержащих клеток в селезенке и приближению его к нормальному ($74{,}4 \pm \pm 5{,}14 \cdot 10^6$, $p < 0{,}05$ по сравнению с основной опытной группой).

Первичный иммунный ответ у мышей после длительного пребывания в атмосфере без БАВ также значительно изменялся. Число прямых АОК селезенки значимо превышало число АОК в контрольных (соответственно $2{,}83 \pm 0{,}34$ и $1{,}487 \pm 0{,}2$ на 10^6 ядросодержащих клеток, $p < 0{,}01$). Сходная картина наблюдалась при расчете числа АОК на всю селезенку. При этом число АОК у мышей, содержавшихся в атмосфере без БАВ, превышало контрольные цифры почти в 3 раза ($930{,}0 \pm 122{,}0$ против $333{,}0 \pm 80{,}8$, $p < 0{,}01$). Введение эфирного масла монарды в состав атмосферы, лишенной БАВ, практически не влияло на выраженность первичного иммунного ответа (при субоптимальной дозе антигена и ранних сроках развития ответа). Число АОК у мышей этой группы в среднем составляло $2{,}78 \pm 0{,}36 \times \times 10^6$ или 713 ± 120 при расчете на всю селезенку (разница незначима по сравнению с показателями в группе, нахо-

дившейся в атмосфере без БАВ, и значима по сравнению с контролем, $p<0{,}05$).

Таким образом, достаточно длительное пребывание животных в атмосфере, лишенной БАВ, сопровождалось изменениями со стороны иммунной системы, а именно, увеличением абсолютного количества ядросодержащих клеток селезенки и более активным формированием первичного иммунного ответа. Возможно, что первоначальная стимуляция ответа, свидетельствующая, по-видимому, о некотором напряжении иммунной системы, при более продолжительном пребывании в атмосфере без БАВ может смениться угнетением иммунных реакций за счет их истощения. Введение летучих фракций эфирного масла монарды в состав атмосферы, лишенной БАВ, в некоторой степени нормализует эффект ее влияния на иммунную систему, что подтверждается уменьшением количества ядросодержащих клеток в селезенке. Однако в данных условиях эксперимента летучие фракции БАВ не оказывали нормализующего действия на повышенный первичный гуморальный ответ. Можно сделать несколько предположений. Возможно, что эффект эфирного масла монарды был бы более выражен при большей продолжительности пребывания животных в условиях гермообъема, когда состояние иммунной системы было бы изменено в большей степени, т. е. фаза «раздражения» (повышенный первичный иммунный ответ) сменилась бы фазой угнетения. Вероятно также, что использованная схема введения БАВ не была достаточно оптимальной. Вместе с тем достаточно четко показано, что летучие фракции БАВ и, в частности, эфирного масла монарды способны влиять на состояние иммунной системы, измененной под действием атмосферы, лишенной БАВ природного происхождения.

В заключение следует отметить, что с помощью разработанной методики достаточно наглядно выявляются изменения функциональной активности органов и систем животных и людей, бывших длительное время в атмосфере, лишенной фитонцидов. Эта методика может с успехом использоваться для изучения не только нарушений метаболизма в клетках в условиях дефицита БАВ, но и действия как отдельных летучих фракций эфирных масел так и их композиций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аверинов Е. Л. О механизме действия некоторых растительных препаратов.— В кн.: Фитоициды. Роль в биогеоценозах, значенне для медициины.— Киев, 1981, с. 83—86.
Адигезалова-Полчаева К. А.. Сулейманов А. Г., Алиев Р. Н., Алиханова У. М. Лечебное действие растительных аитибиотнков на основе интерфероиогенов на герпетнческие кератины.— В ки.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, зиачение для медицины.— Киев, 1981, с. 283—286.
Айзенман Б. Е., Дербенцова Н. А., Мищенкова Е. Л., Литвин Л. Н. Об аитибнотнческнх свойствах папоротника мужского (Dryopteris Filix Mas L. Schatz).— В кн.: Фнтонциды.— Киев, 1975, с. 132—136.
Акимов Ю. А., Остапчук И. Ф. Действие эфнрных масел иа патогениую микрофлору оргаиов дыхаиия.— В ки.: Симпознум по эфнромасличным растениям н маслам. 4-й. Тезисы докладов.— Симферополь, 1985, ч. 2, с. 42—42.
Андропова Н. Н. Аитимикробиое действие фитоицидов некоторых хвойных пород ботанического сада Ужгородского Госуниверситета.— В кн.: Фнтоициды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 47—48.
Апт А. С., Мороз А. М., Никоненко Б. В. и др. Воздействие специфической аллоаитисыворотки протнв Т-супрессоров на показатели клеточного иммунитета при экспериментальном туберкулезе.— Иммунологня, 1984, № 5, с. 26—29.
Арзамасцев Е. В., Миронова М. И. Некоторые аспекты экспериментального токсикологического изучення аитнмнкробных препаратов из растений.— В кн.: Фитоициды. Бактериальиые болезни растеиий.— Кнев, 1985, ч. 1, с. 100—101.
Архипенко Ю. В., Коган В. Е., Козлов Ю. П., Ритов В. Б. Эидогеиные перекиси лнпидов — модифнкаторы проницаемостн бнологнческнх мембраи.— В ки.: Патология мембраиной проницаемости. М., 1975, с. 13—16.
Богуцкий Б. В., Николаевский В. В., Иванов И. К. и др. Некоторые стороиы механнзма действия эфириого масла моиарды на клетку.— В ки.: Совещанне по проблеме фитонцидов. 8-е. Тезисы докладов.— Киев, 1979, с. 26—27.
Богуцкий Б. В., Николаевский В. В., Еременко А. Е. и др. Влияние эфнриого масла монарды дудчатой на живые клеткн in vitro.— В ки.: Фитоицнды. Роль в биогеоценозах. Значение для медицины.— Киев, 1981, с. 87—90.
Боенко С. К., Лавренева Г. В., Лозицкая В. И., Фодерман В. М. Фитотерапия в отоларингологии.— Жури. ушн., иос и горл. бол., 1979, № 6, с. 31—37.

Бондаренко А. С., Резник С. Р., Мещеряков А. А. Иммуностимулирующие и иммунодепрессивные свойства экстрактов и эфирных масел из лекарственных растений.— В кн.: Совещание по проблеме фитонцидов. 8-е. Тезисы докладов.— Киев, 1979, с. 94—95.

Бондаренко А. С. Высшие растения — продуценты антибиотиков.— В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981, с. 204—210.

Бондаренко А. С., Петренко Г. Г., Евсеенко В. В., Павленко Л. А. Антимикробные вещества растений семейства сложноцветных.— В кн.; Фитонциды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 71—72.

Булатов П. К., Злыдников Д. М., Федосеев Г. Б., Хан-Фимина В. А. Применение фитонцидов чеснока для лечения больных с различными воспалительными заболеваниями органов дыхания.— Сов. мед., 1965, № 12, с. 86—90.

Виноградова И. В. Источники получения тимола.— Труды Всесоюзного науч.-исслед. ин-та лекарственных и ароматических растений.— Саратов, 1932, т. 1.— С. 31—35.

Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.

Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.— М.: Наука, 1980.

Волосовец П. С. Химиотерапевтическая эффективность электрофореза новоманином при стафилококковой инфекции мягких тканей в эксперименте.— В кн.: Фитонциды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 116—117.

Волосовец П. С. Антимикробное и противовоспалительное действие новоиманина в условиях гнойного абсцесса в эксперименте.— В кн.: Фитонциды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 117—118.

Воробьев Е. И., Газенко О. Г., Генин А. М. и др. Основные итоги медицинских исследований по программе «Салют-6»—Союз».— Журн. косм. биол., 1984, № 2, с. 22—25.

Вытрищак В. Я., Никитина Н. И. Влияние фитонцидов на фагоцитоз.— Бюлл. экспер. биол., 1962, № 9, с. 85—86.

Газенко О. Г., Ильин Е. А., Генин А. М. и др. Основные результаты физиологических экспериментов с млекопитающими на биоспутнике «Космос-936».— Косм. биол., 1980, № 2, с. 22—25.

Галецкая Т. М., Иванова Е. А., Миронова К. А. Применение розанола у больных хроническим холецистоангиохолитом.— Врач. дело, 1982, № 4, с. 18—20.

Гейхман Л. З. Фитонциды и сердечно-сосудистые заболевания.— В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981, с. 192—196.

Гейхман Л. З. Аэрофитотерапия — преформированный фактор фитоценоза в санаторно-курортном лечении больных с заболеваниями сердца и легких.— В кн.: Актуальные вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 28—29.

Говорун М. И. Влияние эфирного масла лаванды на некоторые показатели клеточного и гуморального иммунитета.— В кн.: Фитонциды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 126—127.

Говорун М. И., Еременко А. Е. Влняние летучих компонентов эфнриого масла лаваиды и базилика иа первичный иммуиный ответ (на Т-зависимый аитнген).— В ки.: Всесоюзный симпозиум по эфиромаслнчным растениям н маслам. 4-й. Тезнсы докладов.— Симферополь, 1985, с. 55—56.

Головко Э. А., Кривенко В. В., Щулипенко А. И. Эффективность применеиия эфирного масла можжевельника обыкиовеиного при гиойиичковых поражениях кожи.— В кн.: Республикаиская коиф. по проблемам алелопатии. 5-я. Тезисы докладов.— Киев, 1982, с. 170—171.

Голотин В. Г., Добрякова А. И., Гоненко В. А., Брехман И. И. О иакоплеиии хииоиов в оргаиизме мышей в условиях гнпероксии.— Журн. косм. биол., 1974, № 3, с. 27—30.

Гукасян А. Б., Степень Р. А. Состав и аитимикробиые свойства эфирного масла ели.— В кн.: Фитоициды. Роль в биогеоцеиозах, зиачение для медициины.— Киев, 1981, с. 116—118.

Данилевский Н. Ф., Зинченко Т. В., Кодача Н. А. Фитотерапия в стоматологин.— Киев.: Здоров'я 1984.

Дзюбак С. Г., Мащучур Ф. И., Томчук Р. И. Антибактериальиые свойства эфирных масел, полученных нз иекоторых растеиий Прикарпатья.— В ки.: Фитоициды.— Киев, 1972, с. 98—100.

Дмитриев М. Т. Газохроматографическое определеине фнтоицидов в воздухе.— Гнг. и саи., 1983, № 7, с. 43—45.

Дмитриев М. Т., Захарченко М. П., Степанова Э. В. и др. Оздоровительиое значение фитонцидиого компоиента атмосферного воздуха.— Здравоохр. Казахстаиа, 1983, № 10, с. 21—24.

Дмитриев М. Т., Грановский Э. Н., Мащихин В. А. и др. Изучение фитонцндов в атмосфере курортов.— Здравоохр. Казахстаиа, 1984, № 10, с. 42—44.

Евсеенко О. В., Бакина Л. А., Маркова Л. П. Аитимикробиая актнвность эфирных масел растеиий рода Artemisia.— В ки.: Фнтоицнды. Бактернальиые болезин растеинй.— Кнев, 1985, ч. 1, с. 75—76.

Еременко А. Е., Тихомиров А. А. Влияине препаратов растнтельиого происхождения иа фагоцитариую актнвиость макрофагов.— В ки.: Республнкаиская конф. молодых ученых-меднков по вопросам кардиологии, иммуиологии, общей и иеотложиой хирургии. 3-я. Черновцы. 1981, с. 227—228.

Еременко А. Е., Говорун М. И. Вещества растительиого происхождения как средства коррекции иммуииого ответа.— В кн.: Фитоицнды. Бактериальиые болезии растеиий.— Кнев, 1985, ч. 1, с. 123—124.

Еременко А. Е., Говорун М. И. Влнянне летучнх компоиеитов эфирного масла лаванды иа параметры первичиого нммуниого ответа у крыс с экспериментальиым воспалительным процессом в легкнх.— В кн.: Всесоюзиый снмпознум по эфнромаслнчным растенням н маслам. 4-й. Тезисы докладов. Снмферополь, 1985, с. 65—66.

Ефремов В. Ф., Синяговская Л. П., Бугаева В. И. Аэрофитотерапия больных, переиесших нифаркт миокарда.— В кн.: Актуальиые вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 30—31.

Ец Г. Е. Применеиие фитоицидов при иекоторых гиойиых заболеваииях.— Хирургия, 1955, № 6, с. 62—64.

Ибрагимов Г. Т., Васильев О. Д. Богомолова Т. С. Сравнительная характеристика противомикробной активности эфирных масел и антифунгальных антибиотиков.— В кн.: Актуальные вопросы медицинской паразитологии и тропической медицины.— Баку, 1983, вып. 3, с. 96—100.

Иванов И. К. Антимикробная активность эфирных масел.— В кн.: Внедрение в практику здравоохранения результатов научных исследований.— Симферополь, 1982, с. 32—33.

Иванов И. К. Действие биологически активных веществ растительного происхождения на микоплазмы и L-формы бактерий.— В кн.: Фитонциды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 155—156.

Иванченко В. А. Растения и работоспособность.— М.: Знание, 1984.

Исаев С. Г., Исаев Г. С. Некоторые механизмы фитотерапии запахами валерианы, душицы, лаванды и герани.— В кн.: Актуальные вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 24—26.

Капелев О. И. Антимикробные и фитонцидные свойства котовника лимонного.— В кн.: Основные направления научных исследований интенсификации эфиромасличного производства. — Симферополь, 1985, ч. 2, с. 74—75.

Капелев О. И., Макарчук Н. М. Антибактериальные и фитонцидные свойства котовника лимонного.— В кн.: Актуальные вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 64—65.

Кашкин П. Н., Безбородов А. М., Елинов Н. П., Цыганков Б. А. Антибиотики.— Л.: Медицина, 1970.

Кимельблат М. А., Шугайло В. Т. Грекова Г. Н. и др. Чувствительность к антибиотикам и химиопрепаратам культур протея, выделенных от больных с острыми кишечными расстройствами.— Антибиотики, 1976, № 10, с. 939—942.

Колодин А. В. Изучение профилактического и лечебного действия препарата СЛФЧ на течение стафилококковой пневмонии белых мышей.— В кн.: Совещание по проблеме фитонцидов. 8-е. Тезисы докладов.— Киев, 1979, с. 105—106.

Колодин А. В. Профилактическое и лечебное действие препарата СЛФЧ на стафилококковую пневмонию белых мышей.— В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981, с. 216—218.

Комарова М. А. О влиянии препарата из хвои сибирской пихты на некоторые показатели естественного иммунитета.— В кн.: Фитонциды.— Киев, 1975, с. 263—265.

Король О. И. Иммунологическая недостаточность в патогенезе хронического бронхита.— В кн.: Хронический бронхит и легочное сердце. Л., 1983, с. 21—23.

Коротков В. М. Значение фитонцидов в профилактике острых воспалительных процессов.— Экспер. хир., 1966, № 5, с. 61—62.

Корсун В. Ф. Растения и здоровье.— Минск: Наука и техника, 1983.

Кривенко В. В. Макарчук Н. М., Сгибнев А. К., Кузнецов В. В. О влиянии летучих биологически активных веществ и легких отрицательных ионов на сердечно-сосудистую систему операторов.— В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981, с. 197—201.

Крылов А. А., Марченко В. А. Актуальные вопросы теории и практики фитотерапии в современной медицине.— В кн.: Актуальные вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск. 1985, с. 11—12.

Крутенко Е. Г., Зеленгур Н. Е. Моиарда — новое эфиромасличное растеине.— В ки.: Актуальные вопросы изучеиия и использоваиия эфиромасличиых растеиий и эфириых масел.— Симферополь, 1980, с. 105—106.

Кушнирова О. П., Смеренская А. В., Брич Л. Н. Действие хлорофилиппта иа показатели фагоцитоза.— В ки.: Фитоициды. Бактериальные болезии растеиий.— Киев, 1985, ч. 1, с. 123—124.

Кушнирова О. П., Туряница А. И., Токарчик Н. М. Действие экстрактов из листьев и плодов ореха грецкого на иекоторые показатели иммуиологической реактивиости.— В ки.: Фитоициды. Бактериальные болезии растеиий.— Киев, 1985, ч. 1, с. 125—126.

Лещинская Я. С., Макарчук Н. М., Кривенко В. В., Багацкая Т. С. Фитоициды и гигиеиа труда.— В ки.: Республикаиская коиф. по проблемам аллелопатии.— Киев, 1982, с. 165—167.

Лещинская Я. С., Макарчук Н. М., Лебеда А. Ф. и др. Влияиие фитоцидов иа дииамику мозгового кровообращеиия у диспетчеров в условиях производствеииого труда.— Косм. биол., 1983, № 2, с. 80—83.

Лещинская Я. С., Лебеда А. Ф., Кривенко В. В. Влияиие фитоицидов иа фуикциоиальное состояиие сердечио-сосудистой системы у лиц физического и умствеииого труда.— В ки.: Актуальные вопросы курортиой фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 67—68.

Лещинская Я. С., Макарчук Н. М., Кривенко В. В., Багацкая Т. С. Влияиие летучих фитоицидов иа фуикциоиальное состояиие сердечио-сосудистой системы оператора.— В ки.: Фитоициды. Бактериальные болезии растеиий.— Киев, 1985, ч. I, с. 131—132.

Лушанский С. С., Соломченко П. И., Заславская А. Г. и др. Примеиеиие иекоторых фитоицидиых препаратов в комплексиой терапии туберкулеза легких, иеспецифических заболеваиий легких и дыхательиых путей.— В ки.: Фитоициды. Роль в биогеоцеиозах, значеиие для медициыы.— Киев, 1981, с. 271—274.

Макарчук Н. М., Кривенко В. В., Акимов Ю. А., Сгибнев А. К. Измеиеиие общей реактивиости оргаиизма в процессе трудовой активиости под влияиием фитоиоиоаэрозоля.— В ки.: Фитоициды. Роль в биогеоцеиозах, зиачеиие для медицииы.— Киев, 1981, с. 189—192.

Макарчук Н. М., Лещинская Я. С., Лебедева А. Ф. и др. Фитоицидиые свойства композиции летучих веществ высших растеиий.— В ки.: Республикаиская коиф. по проблемам аллелопатии.— Киев, 1982, с. 165—166.

Макарчук Н. М., Лещинская Я. С., Лебеда А. Ф. и др. Аитимикробное действие фитоицидов и их влияиие иа общую реактивиость оргаиизма.— В ки.: Актуальные вопросы курортиой фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 66—67.

Макарчук Н. М., Лещинская Я. С., Кривенко В. В. и др. Примеиеиие фитоицидов для саиации воздуха закрытых помещеиий.— В ки.: Фитоициды. Бактериальные болезии растеиий.— Киев, 1985, ч. 1, с. 143—144.

Мишенкова Е. Л. Некоторые стороиы мехаиизма действия препарата 6-аитибиотика из растеиия.— В ки.: Фитоициды. Бактериальные болезии растеиий. Киев, 1985, ч. 1, с. 120—121.

Мовчан Н. А., Лапина И. К. О влияиии фитоицидов иа морфологию бактериальиой клетки.— В ки.: Фитоициды.— Киев, 1975, с. 169—174.

Молотков В. Н. Фитонцидотерапия больных хронической пневмонией.— В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981, с. 274—276.
Неграш А. К. Изучение стимулирующих и противовоспалительных свойств антибиотиков растительного происхождения.— В кн.: Фитонциды.— Киев, 1975, с. 257—263.
Неграш А. К. Антитоксические свойства антибиотиков растительного происхождения в отношении альфа-токсина золотистого стафилококка.— В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины. Киев, 1981, с. 255—257.
Незговоров Г. И., Капелева А. И. Гераськин Г. И. Эффективность комплексного использования фитотерапии и климатопроцедур при заболеваниях органов дыхания.— В кн.: Актуальные вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 27—28.
Никитин А. В., Навашин С. М. Иммуностимуляторы природного происхождения.— Антибиотики, 1983, № 8, с. 702—716.
Николаевский В. В., Еременко А. Е., Иванов И. К., Тихомиров А. А. Гипосенсибилизирующее средство.— В кн.: Симпозиум аллергологических и иммунологических обществ социалистических стран. 3-й. Тезисы докладов. Сухуми, 1979, с. 226—227.
Николаевский В. В., Еременко А. Е., Говорун М. И., Иванов И. К. Коррекция нарушений иммунологической реактивности биологически активными веществами растительного происхождения.— В кн.: Коррекция нарушений иммунологической реактивности. Ивано-Франковск, 1983, с. 155—156.
Николаевский В. В. Биологическая активность эфирных масел.— В кн.: Всесоюзный симпозиум по эфиромасличным растениям и маслам. 4-й. Тезисы докладов.— Симферополь, 1985, с. 96—96.
Николаевский В. В. К вопросу о перспективе использования фитонцидов в санаторно-курортной практике.— В кн.: Фитонциды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 26—27.
Николаевский В. В., Иванов И. К. Антиоксидантные свойства биологически активных веществ растительного происхождения.— В кн.: Актуальные вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 51—53.
Николаевский В. В., Зельцфас А. А., Курченко В. Д. Биотрансформация эфирного масла лаванды.— В кн.: Актуальные вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 61—62.
Николаевский В. В., Степанов Г. С., Полякова О. И. Влияние биологически активных веществ растительного происхождения на содержание кортикостерона в крови.— В кн.: Фитонциды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 140—141.
Николаевский В. В., Костин Н. Ф., Хохлова А. П. и др. Ароматотерапия в комплексном курортно-климатическом лечении больных хроническим бронхитом.— В кн.: Всесоюзный симпозиум по эфиромасличным растениям и маслам. 4-й Тезисы докладов.— Симферополь, 1985, с. 97—97.
Николаевский В. В., Курченко В. Д., Еременко А. Е., Иванов И. К. Экспериментальное изучение безвредности эфирных масел монарды и базилика.— В кн.: Актуальные вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 26—27.
Николаевский В. В., Еременко А. Е., Говорун М. И., Курченко В. Д. Влияние веществ растительного происхождения на макрофагальную систему.— В кн. Актуальные вопросы курортной фитотерапии.— Пятигорск, 1985, с. 50—51.

Орлова Э. А., Хаертынов С. Х., Блюмкин В. Н., Блюмкин В. Н. Влияние экстракта чеснока на культуры клеток.— В кн.: Фитонциды.— Киев, 1975, с. 281—283.
Остапчук И. Ф., Акимов Ю. А., Щуткин В. М. и др. Фитотерапия в санаторно-курортном лечении больных ХНЗЛ.— В кн.: Всесоюзный съезд физиотерапевтов и курортологов. 8-й. Материалы.— М., 1983, с. 263—264.
Остапчук И. Ф., Акимов Ю. А., Захаренко Г. С. и др. Аэрофитотерапия — метод реабилитации и вторичной профилактики заболеваний легких.— В кн.: Фитонциды. Бактериальные болезни растений. Киев, 1985, ч. 1, с. 113—114.
Панасюк Е. Н., Скакун Л. Н. Активация перекисного окисления липидов в печени крыс при гипокинезии и предупреждение ее антиоксидантами.— Косм. биол., 1985, № 1, с. 48—52.
Петров Р. В., Лебедев К. А. Диагностика иммунопатологических состояний на основании оценки баланса в функционировании компонентов иммунной системы.— Иммунология, 1984, № 6, с. 38—43.
Петрусевич Ю. М. Антиокислительные свойства фенолов растительного и животного происхождения.— В кн.: Биоантиокислители.— М., 1975, с. 247—251.
Прокопчук А. Ф., Лазаренко Л. Ф., Вяземский О. Ф. Прокопчук Ю. А. Получение экстракционных препаратов тысячелистника и зверобоя и испытание их противоожогового действия.— В кн.: Совещание по проблемам фитонцидов. 8-е. Тезисы докладов.— Киев, 1979, с. 102—103.
Походзей И. В., Быкова А. В., Мовчан А. И. и др. Особенности иммунологической реактивности больных хроническим бронхитом. В кн. Хронический бронхит и легочное сердце.— Л., 1983, с. 19—21.
Преображенская Н. Е., Сацыперова Н. Ф., Ткаченко К. Т. Действие эфирных масел борщевиков на фитопатогенные бактерии и грибы.— В кн. Фитонциды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 74—75.
Приходько В. А. Антимикробные свойства бакучиола в опытах in vitro и in vivo. В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981, с. 218—220.
Приходько В. А. Влияние антибиотика бакучиола на макроорганизм.— В кн.: Фитонциды. Бактериальные болезни растений.— Киев, 1985, ч. 1, с. 130—131.
Разумович М. Б. О физиологической активности летучих фитонцидов.— В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981, с. 185—189.
Рамазанова Н. Х. О перспективном использовании некоторых эфиромасличных растений.— В кн.: Актуальные вопросы изучения и использования эфиромасличных растений эфирных масел.— Симферополь, 1980, с. 125—125.
Рахимова И. В., Пулостова Т. П. Изучение антимикробных свойств некоторых растений семейства губоцветных.— В кн.: Фитонциды.— Киев, 1974, с. 94—96.
Рощина В. Д. Возможные механизмы действия фитонцидов.— В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981, с. 80—82.
Сафарли-Бабаева Ш. Р. Эффективность лечения ожогов и инфицированных ран глаз препаратом эвкалипта.— В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины.— Киев, 1981, с. 281—283.

Слабоспицкая А. Т., Резник С. Р., Крымовская С. С. К механизму лечебиого действия антибиотиков растительной природы.— В ки.: Фитоициды. Бактериальные болезии растеиий.— Киев, 1985, ч. 1, с. 118—119.

Смирнов В. В., Бондаренко А. С., Айзенман Б. Е. Изучение антимикробиых веществ высших растеиий флоры различиых регионов мира.— В ки.: Фитоициды. Бактериальные болезии растеиий.— Киев, 1985, ч. 1, с. 6—8.

Спивак М. Ф. О влияиии фитоцидииа иа иеспецифический иммунитет.— Жури. микробиол., 1965, № 3, с. 145—147.

Спивак М. Ф., Суханов А. Ф. Влияиие фитоцидииа иа регеиерацию.— Экспер. хир., 1965, № 1, с. 69—70.

Суздальцева А. А., Капичников М. М., Шальминова Ю. А. и др. Влияиие иигибитора-аитиоксидаита из класса 3-оксипиридииа иа реакции клеточиого иммуиитета.— Бюлл., экспер. биол., 1982, № 2, с. 49—50.

Талдыкин О. Е. Использоваиие фитоицидиой активиости эфирных масел для оздоровления воздуха закрытых помещеиий.— В ки.: Фитоициды. Роль в биогеоцеиозах, зиачение для медицины.— Киев, 1981. с. 201—203.

Танасиенко. Эфириые масла. Содержаиие и состав в растеииях.— Киев: Наукова думка. 1985.

Таран Д. Д. Противовоспалительиые свойства эфириых масел некоторых видов полыией и тысячелистиика.— В ки.: Вопросы теоретической и клииической медицииы.— Томск, 1982, вып. 9, с. 106—107.

Токин Б. П. Целебиые яды растеиий.— Л.: ЛГУ, 1980.

Тютюнник В. И., Пономарева Н. Г., Кривошеин Ю. С. Ромаскевич А. И. Аитимикробиое действие эфириых масел, выделеиных из растеиий. В ки.: Выращиваиие и переработка эфиромаслнчиых культур.— Симферополь, 1977, с. 27—33.

Ушаков А. С., Козинец Г. И., Иванова С. М., Матвиенко В. П. Характеристика структурио-фуикциоиальных свойств и энергетического обмеиа эритроцитов при космических полетах различной продолжительиости.— Космич. биол., 1982, № 1, с. 34—37.

Фалк И. И. Применение растительиого антибиотика ареиарииа при лечении ожогов глаз.— В кн.: Фитоициды. Эксперимеитальиое исследоваиие вопросов теории и практики.— Киев, 1975, с. 241—242.

Царалунга А. В., Ермаков А. Е. Влияиие фитонцидов различиых лесиых иасаждеиий иа оргаиизм здорового человека.— В ки.: Фитонциды. Бактериальные болезии растеиий.— Киев, 1985, ч. 1, с. 129—129.

Чекман И. С., Гольта Л. Г., Кривенко В. В., Макарчук Н. М. Влияиие композиций БАВ иа функциональиое состояиие печени животиых.— В кн.: Республикаиская конф. по проблемам аллелопатии. 5-я. Тезисы докладов.— Киев, 1982, с. 179—180.

Чекман И. С., Голота Л. О. Фармакологические свойства композиции биологически активиых эфириых масел.— В кн.: Фитоициды. Бактериальные болезии растеиий.— Киев, 1985, ч. 1, с. 137—138.

Шаповал В. В. Эфириые масла в повышеиии общей резистеитности организма при точиостиой двигательиой деятельиости.— В ки.: Фитонциды. Бактериальные болезии растеиий.— Киев, 1985, ч. 1, 134—135.

Щербановский Л. Р., Капелев И. Г., Чиркина Н. Н., Кирманова Н. Ф. Антимикробиые свойства эфнрного масла укропа. —В кн.: Фитоциды.— Киев, 1975, с. 150—152.
Юрчак Д. Д., Гордеева А. К. Перспективы практнческого использования эфнрных масел для санацнн воздуха закрытых помещений. — В кн.: Республнканская конф. по проблемам аллелопатин. 5-я. Тезисы докладов.— Кнев, 1982, с. 168—170.
Юрчак Д. Д., Юрчак В. Ф., Побирченко Г. А. и др. Бнологнческая активность летучнх выделенний и изолнрованных эфнрных масел четырех вндов можжевельннка.— В кн.: Фитоцнды. Бактернальные болезни растеиний.— Кнев, 1985, ч. 1, с. 64—65.

Ames B. N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria.— In: Chemical mutagens. Principls and methods for their detection.— New York—London, 1971, vol. 1, p. 267—282.
Becker L. G., Rudback J. A., Altered antibody responses in mice treated with toxins for macrophages.— J. Rethiculendotelial Soc., 1979, vol. 25, N 4, p. 443—454.
Dayal B., Purohit R. M. Etudes des propriétés antifongigues de quelques huiles essentielles de l'Indle (Xanthoscylum alatum, Pavonia odorata, Kaemphera galauga, Andropogou iwarancusa, Justicia procumbans, opiorriza mungos. Hantlum strumarrium, Anethum aowa).— In: The Flavour industry. London, 1971, vol. 2, N 8, p. 484—485.
Ganguly R., Waldman R. H. Respiratory tract cell-mediated immunity.— Bull. Europ. Physiopathol. Resp., 1977, vol. 13, N 1, p. 95—102.
Green G. M., Jacab C. J., Low R. B., Davis G. S. Defens mechanism of the respiratory membrane.— Amer. Rev. resp. Dis., 1977, vol. 115.
Gross G. N. The effect of complement depletion on lung clearance of bacteria.— J. clin. Invest., 1978, vol. 62, N 2, p. 373—378.
Jain S. R., Kar A. The antibacterial activity of some essential oils and their combinations.— Planta Med., 1971, vol. 20, N 20, p. 118—123.
Jain S. R., Jain M. R. Effect of some common essential iols on pathogenic fungi.— Planta Med., 1973. vol. 24, N 2, p. 127—132.
Kaltreider H. B. Expression of immune mechanism in the lung.— Amer. Rev. resp. Dis., 1976, vol. 113, p. 347—379.
Lenis S. A., Altemeier W. A. Correlation of in vitro resistance of staphylococcus aureus to tetracycline, deoxycycline and minocycline in vivo use.— Chemotherapy (Basel), 1976, vol. 22, N 5, p. 319—323.
Pryjma J. R. Local immunity of the respiratory tract.— Poumon coeur, 1982, vol. 38, N 5, p. 277—281.
Rad B. Cr., Rad P. S. The efficacy of some essential oils on pathogenic fungi.— Flavour Industry, 1972, vol. 3, N 7, p. 368—370.
Roels OA. Present knowlege of vitamin E.— Nutr. Rev., 1967, vol. 25,
Southill J. Immune deficiency and allergy.— In: Progress in immunology.— Amsterdam, 1974, vol. 5, p. 183—200.
Weiss A., Fitch F. W. Supression of plaque-forming response by macrophages present in the normal rat spleen.— J. Immunol., 1978, vol. 120, p. 257—262.
Yoshikai Y. The Supressive effect of peritoneal macrophages on production of antibody to sheep erythrocytes in vitro.— Cell Immunol., 1983, vol. 77, N 2, p. 266—278.
Yoshikai Y., Miaka S., Matsumoto T. et al. Effect of stimulation and blocade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBS in mice.— Immunology, 1979, vol. 38, N 3, p. 577—583.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1 р. 10 к.

Медицина 1987